

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO GENÉTICO DE LA FUNCIÓN Y
REGULACIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE
CICLINA 2, CDK2. IMPORTANCIA DE CDK2 EN
TUMORIGÉNESIS**

TESIS DOCTORAL

ALBERTO MARTÍN MARTÍN

MADRID, 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO GENÉTICO DE LA FUNCIÓN Y
REGULACIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE
CICLINA 2, CDK2. IMPORTANCIA DE CDK2 EN
TUMORIGÉNESIS**

Memoria presentada por Alberto Martín Martín, licenciado en Biología, para
optar al grado de Doctor

*Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Programa de Oncología Molecular
del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
bajo la dirección del doctor Mariano Barbacid*

A Julio

A mis padres y a Carolina

Hace ya más de cinco años que empecé en esto del mundillo de la ciencia no muy convencido de quererme dedicar a ello, he de confesarlo, pero estimulado con la idea de empezar en algo diferente que rompiese con todo lo anterior y que incluso con suerte pudiera llegar a gustarme. Transcurrido el tiempo tengo que reconocer que la experiencia ha merecido la pena a pesar de todas las dificultades, algunas con nombres y apellidos, que he tenido que superar pero que me han servido para crecer personal y profesionalmente. La culpa de este balance positivo la tienen muchas de las personas que he conocido durante todo este tiempo y que con su confianza y apoyo me han permitido alcanzar una meta que veía entonces muy lejana.

Gracias a Mariano Barbacid por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su confianza en mi trabajo con el que he disfrutado.

La realización de esta tesis se la debo en gran medida a la que fue mi compañera y será siempre mi amiga Junko Odajima. Tuve la inmensa suerte de iniciarme en la investigación contigo y de aprender de ti la mayor parte de las cosas que a día de hoy sé y que son muy pocas para alguien que me enseñó tanto. Todo ello gracias a tu ejemplo continuo (personal y profesional), tu infinita paciencia y tu comprensión en los momentos difíciles. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí.

La suerte quiso que tras la marcha de Jun llegara al labo un atlético de pro, hombre de talante, con una paciencia de santo y una capacidad de trabajo admirable. Sí David, esto va por ti. Siempre te has ofrecido a ayudarme (y hablo en nombre de muchos) de forma desinteresada, dejando de lado tus problemas y volcándote en los míos. Puede que yo no te haya correspondido de la misma manera. Son cosas que nunca olvidaré y por las que te doy las gracias.

A los dos nombres que acabo de mencionar les siguen otros tantos igual de especiales:

Julito, no sabes cuánto te echo de menos. Te tengo presente todos los días y me acuerdo mucho de nuestras conversaciones con las que me animabas tanto cuando las cosas no iban como cabía desear. Tú me has enseñado con tu ejemplo a afrontar la vida con entusiasmo, sentido del humor y valentía. Que sepas que has dejado una huella imborrable en mi vida y en la de otros muchos. Gracias

Cuando me enteré que llegaba un francés al laboratorio nunca me habría imaginado a un tío tan cachondo como tú, franchute. Desde nuestra primera charla (do you have dogs?) hasta aquellos temas de conversación tan apasionantes que sacabas durante las comidas del cnio (no es momento de recordarlos) me lo has hecho pasar en grande y eso me ha ayudado muchas veces a encarar situaciones difíciles con optimismo. Cedric, gracias por ser mi amigo.

Respecto a ti Yeli que sepas que los 30 años te han sentado bárbaros, vamos que estás igual de bien que la primera vez que te vi con aquel mono blanco en cuarentena. Gracias por haberme ofrecido tu amistad, por las noches de juerga madrileña que pasamos junto a Julio y Cedric y por tu compañerismo que nunca me ha faltado.

Ganuja, que ya te queda menos para descifrar los enigmas del quinoma murino. ¿Qué será lo próximo? Como a base de mueslis, yogures y comida sana tu vida será harto larga no me atrevo a imaginar los nuevos retos que te propondrás. No cambies nunca. Eres un tío de p.m. ¿seguirás comiendo a las 3:29? Gracias por tu amistad

Lo siguiente va dirigido a la persona con el corazón más grande del cnio. Efectivamente se trata de la mujer cambiante (¿cuántas veces has decidido ser una mujer nueva?), de signo zodiacal libra y natural de Castroverde de Campos provincia de Zamora. Acertaste Rasqui, eres tú. Las personas buenas y generosas sufren a veces más de la cuenta porque les resulta difícil encontrar a alguien que les corresponda de la misma forma. Yo lo intento aunque no lo consigo la mayor parte de las veces. Gracias

por ser como eres, por lo buena compañera que has sido siempre y por contarme entre tus amigos.

Martita, ha sido una suerte haber podido trabajar tan “estrechamente” (esto te lo digo desde la amistad) contigo si bien tanta cercanía ha resultado un tanto peligrosa y me ha llevado a probar tu gancho de derecha repetidas veces. ¡¡¡¡Qué es broma!!!! Admiro tu inmensa capacidad de trabajo y, aunque no te lo creas, lo bien amueblada que tienes la cabeza, lo cual en tu condición de niña bien te honra enormemente (Antonio no te rías). Gracias por ser mi amiga, por haberme demostrado que puedo contar contigo en todo momento y por la generosidad que derrochas siempre.

La Caro, la Caro, la Caro es cojo..da, como la Caro no hay ninguna. Ahora es cuando tú dices “ no seas ordinario, fonchi”. Fuiste una brisa de aire fresco que llegó al labo cuando más se necesitaba (es un poco cursi pero es verdad). Nos subiste la moral a todos (a lo mejor a Javier algo más) y con ese acento argentino tan bárbaro que te gastas me has hecho pasar momentos muy divertidos. Te lo agradezco sinceramente. Nos llamamos, ¿vale? (ya sabes, esto hay que decirlo con el movimiento de mano apropiado). Gracias por todo camarada Aguilera.

Ana Cerezo, que no me olvido de ti. Lo nuestro fue breve pero intenso, laboralmente hablando quiero decir. Aunque ahora nos vemos poco debido a tu reciente maternidad, cuando se forja una amistad como la nuestra el tiempo no la destruye tan fácilmente. Gracias por tu amistad.

Javier y Antonio, sois mi pareja favorita. He pasado tardes inolvidables que ni dúos tan emblemáticos como el Gordo y el Flaco, Tip y Coll o Martes y Trece han logrado igualar. Galán, ¡ a ver para cuando la quinta guitarra!. Mucha suerte en la recta final de la tesis. Antonio, ha sido “a great privilege for me “ haber trabajado junto a un tío tan majete como tú.

Alma, que no decaigan esos ánimos. Ya estás en el tramo final de la tesis y es ahora cuando se requiere un poco más de paciencia y tesón. Al final quien la sigue la consigue. Recuerdo nuestro primer día con esas caras de alelados que eran todo un poema. Y fíjate ahora, capitanes generales como decía Juan Velasco. Gracias por todo

San Romanchi, ¿ qué haces que no estás haciendo una probatina?. ¿Y el pCLEco? Gracias por la ayuda que me has prestado durante todos estos años y la paciencia que has demostrado tener conmigo en repetidas ocasiones. Sé que a veces es difícil aguantarme. Mira por allí viene MP cargadita de litros (nada de múltiplos o submúltiplos) de LB....

Muchas gracias también a Chumi (¿para cuándo el nobel?), Maricarmen Guerra (a las barricadas, a las barricadas.....), Maricarmen G. Lechuga (no pierdas esa risa contagiosa que tanto me gusta), Lena (cuidado con los deportes de riesgo, que luego pasa lo que pasa), Ruti (antes muerta que sencilla, que sencilla.....), Matthias y Pati (suerte con vuestra próxima paternidad), Rafa (¿ te pondrás rabioso si te recuerdo lo del bonobú o lo de Pedro Reyes? Seguro que sí por eso te lo pregunto. Ja,ja,ja.... Mucha suerte), Eli (no pierdas tu energía y sentido del humor, por mucho miedo que les de a los suizos. Son unos sosos), Claudine (¿No seguirás escuchando a la Oreja de Van Gogh y al Alex “lumbago” ese? Te deseo lo mejor) y Sara (la recién llegada que me regaló ese súper disco de música francesa que tanto me gusta. ¡ qué bien me conoces!). No quisiera olvidarme tampoco de los antiguos miembros del labo, predoctorales , postdoctorales y científicos de plantilla, con los que coincidí en algún momento y que siempre me dieron sabios y alentadores consejos (Sarita, Javier, Nieves, Rocío, Sagrario, Mariví y Marcos). Lourdes, no te olvido, sigues muy presente en mi corazón. A pesar del poco tiempo que pasaste en el labo aprendí muchas cosas de ti. Personas como tú se conocen muy de tarde en tarde pero cuando eso ocurre es todo un privilegio.

Hago extensiva mi gratitud a todo el personal del cnio y de fuera de él, que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta tesis doctoral: Pierre Dubus, excelente patólogo y mejor persona, Unidad de Animalario (Juan Martín Caballero, Isabel Blanco, Jordi, Rosa, Nati, Blanca, Maribel, Nacho, Tomás, Sergio, Alex, Sheila, Auri....), Unidad de Patología Comparada (Lucía, Marta, Patri, Valle, Virginia.....), Unidad de Secuenciación, Unidad de Transgénicos (Jaime, Marta Riffo, Carmen Gómez, Javier y Sagrario), Bioseguridad (Narciso y compañía), personal de la cuarta planta, y a nuestra Secretaria de departamento, Susa, siempre dispuesta a echar un cable con lo que sea. Millones de gracias a todos. Mi agradecimiento también para el servicio de limpieza, en especial para María, (eres una mujer admirable, tremendamente luchadora..... todo lo que diga es poco), a todos los empleados de Cafetería (Emma, Lola, Fátima, la jerezana salerosa, Alfonso....) y a compañeros de otros laboratorios cuya enumeración sería interminable.

¿Y que hay de mis amigos salmantinos? Sois uno de mis mayores tesoros. Gracias por aguantarme y por animarme cuando más lo he necesitado. Mi vida sería muy triste sin vosotros. Gracias Álvaro, Bea, Cris, Javi Charli, Javi Soto, Héctor, Miguel, Natalia y Pablo. Os quiero un montón.

Gracias a Flori y a Ana, os conozco desde hace mucho y siempre habéis estado apoyándome en los momentos difíciles. Cuando cundía el desánimo siempre tuvisteis palabras de aliento.

También merece un reconocimiento especial mi familia. No olvidaré nunca aquella fiesta de despedida que me hicisteis antes de venir a Madrid. He compartido con vosotros algunos de los momentos más importantes de mi vida que me acompañarán siempre en el recuerdo. Puedo presumir de tener unos tíos y unos primos de primera línea. No sería justo dejar de hacer una mención especial a mi prima Sandra. Eres alguien muy especial para mí que siempre me ha mostrado un apoyo incondicional. Muchas gracias por todo.

Soy lo que soy gracias a mis padres, Gúmer y Mari, y a mi hermana Carolina. A ellos les corresponde el mayor de todos los agradecimientos. Soy inmensamente afortunado por tenerles a mi lado y nunca seré recompensado por nadie ni por nada con una dicha mayor que ésta. Siempre han creído en mí y nunca jamás me han fallado en los momentos claves de mi vida. Os lo debo todo y le doy gracias a Dios por haberme puesto en vuestras vidas. Os quiero con todo mi corazón.

Finalmente aunque no soy el prototipo de cristiano comprometido y ejemplar, sí creo en un Dios bueno que cree en la capacidad del hombre para hacer el bien ayudando a aquellos que más lo necesitan. Ese es el principio que pretendo que rija mi vida, porque sin ese objetivo rector para mí nada tendría sentido. Quizá la ciencia sea una buena plataforma para lograrlo.

1 ÍNDICE

1	ÍNDICE	1
2	RESUMEN	5
3	INTRODUCCIÓN.....	9
3.1	EL CICLO CELULAR: UN PROCESO DE TODO O NADA.....	10
3.1.1	Regulación de la salida de quiescencia y progresión por la fase G1 del ciclo	11
3.1.2	La transición G1/S	13
3.1.3	La fase S del ciclo, la transición G2/M y la salida de mitosis.	15
3.2	CICLINAS DEPENDIENTES DE QUINASAS: ESTRUCTURA Y REGULACIÓN	17
3.2.1	Asociación con ciclinas.....	18
3.2.2	Interacción con moléculas inhibidoras.....	20
3.2.3	Modificaciones post-traduccionales	21
3.3	IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE CDK2 EN EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR.....	22
3.3.1	La actividad Cdk2 en el control de la duplicación de los centrosomas	24
3.3.2	Participación de las Cdk2 en el control de la replicación del material genético.....	26
3.3.3	Otras funciones de Cdk2	27
3.4	REGULACIÓN Y FUNCIONES DE LOS INHIBIDORES Cip/KIP EN EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR	29
3.4.1	Funciones de los inhibidores Cip/Kip.....	30
3.4.2	Modelos animales de pérdida de función (KO) de los inhibidores Cip/Kip.....	34
3.5	IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CDK2 Y DE SUS MECANISMOS DE REGULACIÓN EN LOS PROCESOS NEOPLÁSICOS.....	35
3.5.1	Cdk2	36
3.5.2	Ciclina E	36
3.5.3	p27	37
4	OBJETIVOS	40
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
5.1	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	44
5.1.1	Mantenimiento y genotipaje de los ratones	44
5.1.2	Hepatectomías parciales.....	45
5.1.3	Tratamiento con 4 OH-Tamoxifén	45
5.1.4	Tratamientos con carcinógenos (DMBA/TPA) y análisis de mutaciones.....	46
5.2	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	46
5.2.1	Preparación de fibroblastos embrionarios y condiciones de cultivo	46
5.2.2	Ensayos de proliferación celular	47
5.2.3	Ensayos de formación de focos	48
5.2.4	Transfecciones e infecciones retrovirales.....	48
5.2.5	Irradiación y tratamiento con etopósido	49
5.2.6	Citometría de flujo e inmunotinción de células marcadas con BrdU.....	49
5.2.7	Detección y cuantificación de centrosomas por inmunofluorescencia.....	50
5.2.8	Extracción de ADN y proteínas	50
5.2.9	PCR convencionales.....	50
5.2.10	Western blot.....	51
5.2.11	Inmunoprecipitación y ensayo quinasa	51
5.2.12	Southern blot.....	51
5.2.13	Plásmidos y mutagénesis dirigida	52
6	RESULTADOS	54
6.1	ESTUDIO GENÉTICO DE LA FUNCIÓN DE CDK2 <i>IN VIVO</i> Y SU IMPORTANCIA TERAPÉUTICA COMO DIANA ANTINEOPLÁSICA.	55
6.1.1	Generación de animales defectivos en Cdk2	55
6.1.2	Características fenotípicas de los animales Cdk2 ^{-/-}	57
6.1.3	Estudio de las propiedades proliferativas de MEFs Cdk2 ^{-/-}	61
6.1.4	Análisis bioquímico	64
6.1.5	Cinética de entrada en fase S en MEFs y hepatocitos Cdk2 ^{-/-}	66
6.1.6	Duplicación de centrosomas en MEFs Cdk2 ^{-/-}	69
6.1.7	Fosforilación de Rb en MEFs Cdk2 ^{-/-}	70
6.1.8	Efecto del daño al ADN en MEFs Cdk2 ^{-/-}	71

6.2	IMPLICACIÓN DE CDK2 EN EL PROCESO DE TUMORIGÉNESIS	73
6.2.1	<i>Tratamiento químico de carcinogénesis en piel</i>	74
6.2.2	<i>Efecto de la falta de Cdk2 en dos contextos tumorales: p53^{-/-} y MMTV-Nras</i>	77
6.2.3	<i>Susceptibilidad a la transformación por Ras/E1A de MEFs Cdk2^{-/-} y Cdk2^{lox/lox}</i>	80
6.3	ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS PROPIEDADES CITOSTÁTICAS DE LOS SUPRESORES	
	TUMORALES p21 Y p27 EN AUSENCIA DE CDK2	81
6.3.1	<i>Sobreexpresión de p21 y p27 en MEFs Cdk2^{-/-}</i>	81
6.3.2	<i>Análisis de las consecuencias de la sobreexpresión de formas mutantes de p21 y p27 en ausencia de Cdk2</i>	83
6.3.3	<i>Efecto de la ausencia de Cdk2 en la proliferación de MEFs p21^{-/-} y p27^{-/-}</i>	85
6.3.4	<i>Estudio de la actividad oncogénica por pérdida de los inhibidores Cip/kip en ausencia de Cdk2</i>	87
7	DISCUSIÓN	93
7.1	UN NUEVO PLANTEAMIENTO DEL CICLO CELULAR	94
7.1.1	<i>Cdk2 es dispensable en ciclos mitóticos normales y neoplásicos, pero esencial durante la progresión meiótica</i>	95
7.1.2	<i>Buscando un sustituto para Cdk2: ¿de vuelta al modelo primigenio de levaduras?</i>	97
7.1.3	<i>Funciones de la ciclina E independientes de Cdk2</i>	101
7.1.4	<i>Importancia de Cdk2 como diana antineoplásica</i>	103
7.1.5	<i>Los inhibidores Cip/Kip: algo más que reguladores de la actividad Cdk2</i>	104
8	CONCLUSIONES	109
9	BIBLIOGRAFÍA	113
10	ANEXO	

2 RESUMEN

In order to study the *in vivo* function of Cdk2, we decided to knock down the expression of this Cdk, targeting its endogenous locus by homologous recombination. Cdk2 Knock-out mice were born at the expected mendelian ratio and did not display major phenotypic abnormalities with the exception of the gonads. Both males and females were sterile due to a failure in the prophase of the first meiotic cycle. In males, the lumina of the seminiferous tubules was devoid of post-meiotic cells (round spermatids and spermatozoa) and the tissue architecture was severely atrophied showing a high rate of apoptosis. In females, a dramatic reduction in the number of oocytes was already evident right after birth /during the perinatal period and mature Cdk2^{-/-} ovaries completely lack the corpus lutea and functional follicles. Despite of these abnormalities, the proliferation of germinal stem cells in both the testis and ovaries, was completely normal. This unexpected finding contrast the absence of proliferative defects in somatic cells. In fact, Cdk2 deficient MEFs grow normally in asynchronous culture and exhibit unchanged kinetics during S-phase entry compared to wt cells. Moreover, neither Rb phosphorylation nor centrosome duplication, two processes thought to be critically dependent on Cdk2 function, were affected in a genetic context without this kinase. Although we were able to establish continuously dividing cell lines derived from these mutant MEFs, their immortalization efficiency was lower than wild type MEFs. Extensive biochemical analysis performed in Cdk2^{-/-} protein extracts only revealed reduced expression levels and kinase activity of Cdk1, Cyclin A and Cyclin E, which are probably related to the premature crisis period detected in Cdk2 deficient cells. In addition, mutant mice were able to regenerate their livers after being subjected to partial hepatectomy despite a slight delay in the kinetics. We also examined the functionality of the DNA damage checkpoint in G1 where Cdk2 is also involved. We checked that Cdk2^{-/-} MEFs properly arrest in G1 in response to etoposide treatment and ionizing radiation. Finally we evaluated the potential role played by Cdk2 in tumorigenesis. To this end, Cdk2 deficiency was combined with different tumor prone mutations such as p53 loss, Nras overexpression and those derived from the two stage carcinogenesis protocol. Unfortunately no differences in terms of tumor latency, malignancy or survival were found in a Cdk2^{-/-} scenario.

Cdk2 is supposed to be the main target of the inhibitory activity mediated by the Cip/kip family members (p21, p27 and p57). However, overexpression of p21 and p27 in a Cdk2 deficient background prevents cell cycle progression as efficiently as in control cells indicating that Cdk1-ciclin complexes may play a more important role. In contrast, ectopic expression of a p27 mutant defective in its interaction with different Cdk-cyclin complexes failed to arrest cell proliferation. This fact clearly highlights the relevance of the Cdk inhibition for the cytostatic function of p27. In order to obtain a genetic proof of a functional link between Cdk2 and Cip/kip inhibitors, we generated double Cdk2/p21 and Cdk2/p27 KO animals and MEFs. MEFs lacking Cdk2 and one of the two inhibitors, conserved the same proliferative advantage shown by the single Cip/kip KO cells. In addition, Cdk2^{-/-}; p27^{-/-} and Cdk2^{-/-}; p21^{-/-} animals display the same phenotype exhibited by single p27 or p21 deficiency, respectively. It's clear that further

investigation, such as proteomic approaches, that allow us to identify new targets of these inhibitors, and the design of relevant mouse models to validate genetically these molecular associations, will be required to progress in the knowledge of these cell cycle regulators.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 El ciclo celular: un proceso de todo o nada

Son dos los objetivos que persigue toda célula cuando se divide: asegurar la generación de una sola copia totalmente fiel al molde original de su material genético y garantizar su reparto equitativo entre las dos células hijas resultantes. De este modo las células consiguen salvaguardar su integridad genómica y, por ende, su viabilidad y perpetuación a lo largo de las generaciones. Estos dos procesos tan vitales sirven para definir los dos principales estadios del ciclo celular (Norbury y Nurse, 1992): fase S o fase de síntesis, durante la cual se duplica con total exactitud el contenido genético y fase M o mitosis en la que se produce la segregación de los dobletes cromosómicos de forma que cada una de las células hijas reciba una idéntica dotación genética. Precediendo a cada una de estas dos etapas se han descrito otras dos, denominadas G1 y G2, durante las cuales las células se preparan para el abordaje exitoso de las fases S y M respectivamente. Si la célula decide dejar de proliferar abandona el ciclo celular y entra en una fase de reposo o quiescencia llamada G0 (Fig.1).

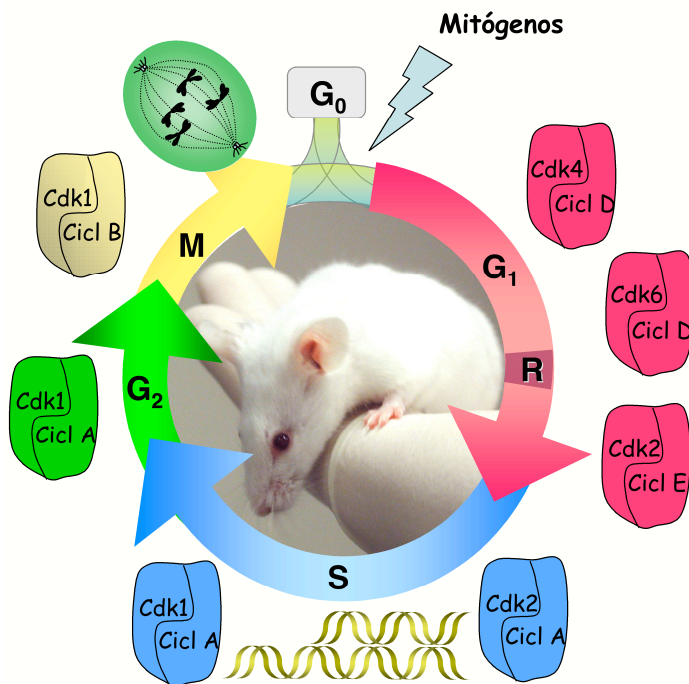


Figura 1. Participación de los distintos complejos Cdk-ciclina en la regulación de cada una de las fases del ciclo de división celular.

A la luz de estos hechos resulta comprensible que los organismos eucariotas dispongan de mecanismos de control altamente sofisticados, adquiridos en el transcurso de la evolución, que les permitan asegurar una correcta ejecución de los procesos anteriormente descritos. Así, en la progresión precisa y ordenada a lo largo de cada una de las fases del ciclo, juegan un papel central un grupo de serín-treonín quinasas llamadas Cdk (quinasas dependientes de ciclinas) (Morgan, 1997). La activación de estas subunidades catalíticas pasa principalmente por su asociación con unas proteínas reguladoras llamadas ciclinas, cuyos niveles de expresión, a diferencia de los de las Cdk, fluctúan a lo largo del ciclo convirtiéndose en uno de los principales factores limitantes de la actividad Cdk (Sherr y Roberts, 2004). Gracias a estas variaciones en la concentración de las ciclinas, se consigue una activación secuencial de cada

uno de estos complejos heterodiméricos Cdk-ciclina, clave para un avance ordenado en el tiempo a lo largo del ciclo.

Aunque existen otros muchos mecanismos reguladores de la actividad quinasa, todos ellos han sido concebidos para generar cambios rápidos y persistentes en dicha actividad por procesos de retroalimentación capaces de producir estos cambios una vez se haya alcanzado un cierto umbral crítico. Desde un punto de vista bastante simplista podríamos considerar el ciclo celular como el producto de un programa de activaciones e inactivaciones súbitas de las Cdk que asegurarían el avance unidireccional del proceso. Esto no significa que la célula no pueda detener su proliferación si detecta cualquier tipo de irregularidad que amenace su integridad. De hecho, a lo largo de todo el ciclo existen repartidos puntos de control o “checkpoints” que impiden a la célula entrar en una nueva fase del ciclo si la anterior no se ha completado correctamente (Hartwell y Weinert, 1989). Son los mismos mecanismos de control que propician la progresión a lo largo del ciclo, los que también participan en su bloqueo.

3.1.1 Regulación de la salida de quiescencia y progresión por la fase G1 del ciclo

Una de las principales decisiones que debe tomar una célula quiescente es si permanecer en ese estado de reposo o por el contrario abandonarlo y entrar en el ciclo de división celular. Es ésta una capacidad que poseen muchas de las células de un organismo adulto, con la excepción de aquellas que han alcanzado un estadio de diferenciación terminal. A este respecto, las condiciones del medio extracelular a través de la disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento... son las que dictaminan la decisión final de la célula (Malumbres y Barbacid, 2001). Las ciclinas que actúan en G1 integran la información que llega al medio intracelular desde su entorno más próximo para dirigir la entrada y progresión del ciclo a lo largo de la fase G1 e iniciar posteriormente la replicación del ADN. Dentro de estos importantes sensores intracelulares se incluyen las tres ciclinas de la familia D (D1, D2 y D3), que en distintas combinaciones se unen regulando de forma alostérica a sus respectivas Cdk, Cdk4 y Cdk6, y las dos ciclinas de la familia E (E1 y E2), que de la misma forma gobiernan la actividad de una única subunidad catalítica, denominada Cdk2 (Sherr, 1996; Sherr y Roberts, 2004; Jones y Kazlauskas 2001) (Fig. 1).

Ante una adecuada estimulación mitogénica, se ponen en marcha distintas rutas de señalización celular que promueven la activación de los complejos Cdk4,6-ciclina D a distintos niveles: transcripción génica, traducción y estabilización de la ciclina D, ensamblaje de las ciclinas D con sus respectivas Cdk e importe de estas holoenzimas al núcleo donde llevan a cabo la fosforilación de sus sustratos (Sherr y Roberts, 1999). Así, por un lado, la activación mitogénica de la ruta Ras/Raf/Mek/Erk eleva considerablemente los niveles del ARNm de la ciclina D1 (Lavoie et al., 1996; Balmain et al., 1999; Peeper et al., 1997; Kerkhoff et al., 1997; Aktas et al., 1997). Por otro, y de forma simultánea, la puesta en marcha de la ruta PI3K/Akt prolonga la vida media de la ciclina D1 inhibiendo su fosforilación en el residuo T286 catalizada por la quinasa GSK3 β (Diehl et al., 1998; Cross et al., 1995; Alt et al., 2000). Dicha fosforilación

promueve la asociación de la ciclina D1 con la exportina CRM1 y su consiguiente translocación citoplasmática donde será ubiquitinada y degradada por la ruta del proteosoma.

Una vez la célula abandone la fase G1 del ciclo, la actividad de los complejos Cdk4,6-ciclina D no volverá a ser necesaria hasta que, llegado el caso, la célula inicie una nueva ronda de división reentrando en la siguiente fase G1 (Matsushime et al., 1991). En ciclos de división continua, aunque la degradación de ciclina D1 fuera de G1 es especialmente intensa, la síntesis promovida por Ras y la estabilización en G2 permiten su reacumulación antes de que finalice la división celular, de modo que el segundo ciclo se acorta con respecto al primero (Guo et al., 2002). Por el contrario, una retirada de mitógenos o exposición a agentes antiproliferativos como TGF β , frenaría la síntesis de ciclina D1 e incrementaría su degradación, conduciendo a una caída brusca de la actividad quinasa que terminaría devolviendo a la célula, con mayor o menor celeridad, a su estado inicial de reposo. Otra forma de neutralizar una actividad quinasa indeseada, se realiza a través de la interacción de los complejos Cdk-ciclina con moléculas inhibitoras (Sherr y Roberts, 1995; Sherr y Roberts, 1999) (Fig.2). La familia INK4 es una de ellas, e incluye a cuatro miembros: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} los cuales, mediante competición alostérica con la ciclina D por la unión a Cdk4/6, bloquean específicamente la formación y activación de estos complejos (Pavletich, 1999). La senescencia, el estrés oncogénico, la diferenciación y diversas señales antimitogénicas promueven la acción inhibitoria de estas moléculas. Una segunda familia de inhibidores es la integrada por las tres proteínas Cip/ Kip, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} (Sherr y Roberts, 1999; Sherr, 2000; Nakayama y Nakayama, 1998). Su espectro de acción, comparado con el de los inhibidores INK4, que se limita a los complejos cdk4,6-ciclina D, es algo más amplio, alcanzando a otros heterodímeros integrados por Cdk's diferentes, tales como Cdk1 y Cdk2. Aunque su acción inhibitoria sobre estos últimos no parece albergar dudas, sí es objeto de controversia el efecto que pudieran tener sobre los pares Cdk4/6-ciclina D, aspecto que analizaremos con mayor profundidad más adelante.

Durante la fase G1, además de promoverse la síntesis y estabilidad de la ciclina D, se produce también un descenso significativo en los niveles de expresión del inhibidor p27. En esta disminución dependiente de mitógenos participa la ruta de PI3K/Akt que inhibe la síntesis transcripcional de p27 a través de la fosforilación de distintos miembros de la familia forkhead de factores de transcripción. Estos, una vez fosforilados son transportados al citoplasma y, por tanto, alejados de sus regiones promotoras diana (Brunet et al., 1999; Brownawell et al., 2001). De hecho, en la región promotora del gen de p27 se han identificado sitios de unión del factor transcripcional FoxO4 y en un trabajo publicado por Medema et al., (2000) se describe la capacidad de estos factores de transcripción de incrementar la expresión de p27. A este descenso también contribuye y de forma mucho más significativa, la intensa degradación proteolítica promovida, principalmente, por la ubiquitin ligasa KPC (Kamura et al., 2004) en un proceso que, a diferencia del que tendrá lugar durante la transición G1/S, no parece depender ni de la fosforilación en el residuo T187 de p27 ni de la ubiquitin ligasa SCF (Hara et al., 2001).

Aprovechando la todavía reducida actividad quinasa que opera en los primeros momentos de la fase G1, los complejos prereplicativos que empezaron a ensamblarse al final de la mitosis, completan su formación. Así en una secuencia ordenada de interacciones que implica, por este orden, a las proteínas ORC, Cdc6 y Cdt1, y MCM, las regiones cromatínicas de los orígenes de replicación del ADN adquieren la potencialidad de replicarse a falta de su activación final (Bell y Dutta, 2002). Si bien la participación de las Cdk durante estas primeras fases del proceso de replicación está contraindicada en células que se están dividiendo de forma continuada, la implicación de algunas subunidades catalíticas, o al menos de sus ciclinas asociadas, parece ser decisiva en la salida de quiescencia como analizaremos en próximos apartados.

3.1.2 La transición G1/S

A medida que, en respuesta a señales mitogénicas, se van incrementando los niveles de los complejos Cdk4,6-ciclina D, comienza la fosforilación de distintos sustratos cuya modificación posttraduccional es fundamental para la salida de G1. Una de estas dianas es la familia de proteínas del retinoblastoma (a la que llamaremos genéricamente Rb) que comprende tres miembros: Rb, p107 y p130 (Ewen et al., 1993; Kato et al., 1993) (Fig.2). Esta familia de proteínas regula la actividad de una serie de factores de transcripción denominados E2F (Dyson, 1998) de los que depende la expresión de toda una batería de genes cuyos productos son necesarios, entre otras cosas, para la entrada en la fase S (Fig.2). En su forma hipofosforilada y activa, Rb se encuentra interaccionando y bloqueando la actividad transactivadora de los factores E2F a la vez que recluta también diversas moléculas represoras, como histondeacetilasas (HDAC) (Brehm et al., 1998; Luo et al., 1998) y complejos implicados en la remodelación de la cromatina (SWI/SNIF) (Zhang et al., 2000), posicionándolos sobre las regiones promotoras de los genes controlados por E2F (Fig. 2). Se ha visto que, sin estos componentes adicionales, la función represora de Rb no es del todo completa (Zhang et al., 2000). Así, en células con baja actividad HDAC o SWI/SNIF, la sobreexpresión de Rb o de un mutante no fosforilable, no conduce a la consabida parada del ciclo en G1 que sí se produce con la reintroducción de las moléculas ausentes.

Este macrocomplejo represor al ser fosforilado por los complejos Cdk4,6-ciclina D se disocia parcialmente, perdiendo actividad HDAC a la vez que disminuye ligeramente su afinidad de interacción con E2F (Harbour et al., 1999). Este hecho permite el inicio de la expresión de la segunda ciclina de G1, ciclina E (Fig.2), cuyos niveles de actividad quinasa, tras la asociación con su respectiva Cdk, Cdk2 (Koff et al., 1992; Dulic et al., 1992), empiezan a elevarse progresivamente gracias a la concurrencia de varios procesos, en su mayoría, de retroalimentación positiva:

- **Movilización de inhibidores Cip/kip y segundo descenso en los niveles de p27^{Kip1}**

En primer lugar, la incipiente actividad ciclina E, fosforilaría p27 en el residuo T187 (Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997), que es reconocido por la ligasa SCF^{skp2}. Así, esta forma fosforilada de p27 será poliubiquitinada y posteriormente degradada por la ruta del proteosoma (Elledge y Harper 1998; Bloom y Pagano 2003; Nakayama et al., 2001). La eliminación del inhibidor favorecería un aumento cada vez mayor de la actividad ciclina E que intensificaría la degradación proteolítica de p27^{Kip1} y amplificaría el efecto activador sobre los complejos Cdk2-ciclina E. Por otro lado, los complejos Cdk4,6-ciclina D son capaces de retirar del medio inhibidores de la familia Cip/kip, entre ellos p27^{Kip1}, contribuyendo indirectamente a la activación de los dímeros Cdk2-ciclina E, sin que ello signifique, según algunas observaciones, un descenso en la activación de los complejos Cdk4,6-ciclina D (LaBaer et al. 1997; Cheng et al. 1999; Blain et al 1997). Diversos estudios estarían apoyando este papel no catalítico desempeñado por los pares Cdk4,6-ciclina D. Así, se ha comprobado que el bloqueo impuesto por la sobreexpresión de p16 o inducción de p21, puede sortearse con la sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo de Cdk4 que conserva intacta su capacidad de interacción con los inhibidores Cip/Kip. Dicho mutante secuestraría el exceso de p27 o p21 liberando a los complejos Cdk2-ciclina de su efecto inhibidor y devolviéndoles su actividad catalítica (Sherr y Roberts 2004).

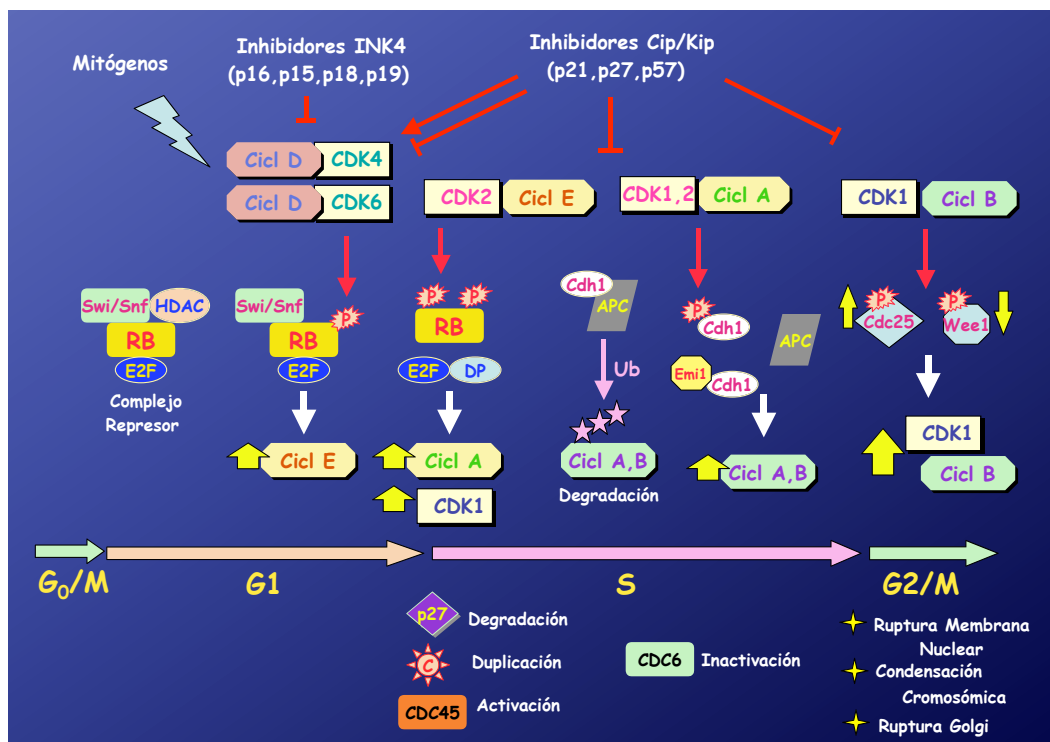


Figura 2. La activación de los complejos Cdk4,6-ciclina D en respuesta a estímulos mitogénicos conduce a una inhibición parcial de Rb que será completada por los dímeros Cdk2-ciclina E, los cuales regulan también la actividad de numerosos sustratos necesarios para la transición G1/S del ciclo celular (p27, Cdc45, proteínas centrosomales...). La inactivación de Rb permite la formación de nuevos heterodímeros Cdk-ciclina, Cdk1-ciclina A primero y Cdk1-ciclina B después, responsables del tránsito celular a lo largo de las fases subsiguientes.

- **Inactivación de Rb**

Los incipientes complejos Cdk2-ciclina E, al igual que Cdk4,6-ciclina D son también capaces de fosforilar Rb aunque, preferentemente, en sitios distintos (Zarkowska y Mitnacht 1997; Kitagawa et al. 1996). Esta segunda ronda fosforilativa completaría la inactivación de Rb que dejaría de interaccionar con los represores SWI/SNIF a la vez que bloquearía definitivamente su unión con los factores E2F (Fig.2). Éstos activarían el programa transcripcional de un gran número de genes entre los que se encuentran los propios factores E2F y la ciclina E (Sherr 1996; Degregori et al., 1995; Soucek et al., 1997; Geng et al., 1996). De este modo, la síntesis de ciclina E, al retroalimentarse positivamente, dejaría de depender de las distintas cascadas de señalización celular activadas en respuesta a señales mitogénicas, y pasaría a depender de su creciente actividad quinasas acumulada.

Gracias a estos mecanismos de retroalimentación positiva, el sistema de control del ciclo celular se convierte en un proceso autónomo, independiente de la activación mitogénica. Es entonces cuando la célula alcanzaría un punto de no retorno que la obligaría irreversiblemente a dividirse, produciéndose una de esas muchas transiciones dramáticas repartidas a lo largo de todo el ciclo. Superado este estadio, denominado punto de restricción, la progresión celular continúa aún en ausencia de estímulos extracelulares (factores de crecimiento, nutrientes, interacción célula-célula....) que, hasta ese momento, se habían erigido como determinantes (Pardee 1989; Sherr 1994). La actividad ciclina D, cuyo principal cometido habría consistido en propiciar la síntesis autosuficiente de ciclina E a través de la fosforilación incipiente de Rb, se convierte en prescindible. La linealidad de esta ruta, ciclina D - Rb - ciclina E y su ordenación secuencial en el tiempo, ha sido demostrada a través de varias aproximaciones experimentales. De este modo, el bloqueo en G1 producido por la sobreexpresión de Rb en numerosos tipos celulares, es contrareestado por la sobreexpresión de ciclina E pero no de ciclina D, ocupando aquélla un lugar más retrasado en la secuencia de acontecimientos (Lukas et al., 1997; Alevizopoulos et al., 1997). Una segunda evidencia la encontramos en la generación de ratones en los que la inactivación del gen de la ciclina D1 se consiguió mediante la introducción en su locus endógeno de la secuencia codificante de la ciclina E. En estos animales se observó una reversión significativa del fenotipo asociado a la falta de ciclina D, lo que indicaría que la función esencial de esta ciclina sería la de activar la síntesis de la ciclina E. (Geng et al., 1999).

3.1.3 La fase S del ciclo, la transición G2/M y la salida de mitosis.

En este escenario molecular de elevada actividad E2F, Cdk2-ciclina E y altos niveles de Rb fosforilado, la célula prosigue su avance a través del ciclo celular y entra en la fase S. Durante este periodo, se inicia la duplicación centrioral, que se prolongará durante la fase G2 y se producirá la replicación del contenido genético. Desde un punto de vista bioquímico los niveles de ciclina E empiezan a decaer. Este hecho, aunque no imprescindible para que la progresión del ciclo continúe, sí se estima importante a la hora de evitar fenómenos de inestabilidad cromosómica que se detectan cuando la vida media de la proteína se alarga más

de lo normal (Spruck et al. 1999). El decaimiento de la actividad quinasa asociada a la ciclina E se consigue fundamentalmente a través de su degradación proteolítica. Se han identificado dos rutas implicadas en este proceso dependientes del sistema ubiquitinación - proteosoma. Por un lado, la ubiquitin ligasa Cul3 es capaz de dirigir la destrucción de monómeros de ciclina E, no asociados a Cdk2, con independencia del estado de fosforilación de la ciclina (Clurman et al., 1996; Singer et al., 1999). La importancia de este mecanismo ha quedado patente con la inactivación endógena de *Cul3*, que limita la supervivencia del animal a los primeros estadios del desarrollo embrionario. Bien es cierto, no obstante, que la desregulación de otros sustratos de Cul3 podrían estar también contribuyendo de forma decisiva a este fenotipo. Una segunda ubiquitin ligasa, SCF, conjugada con la proteína F-box, Cdc4 (también designada como Fbw7 y Ago), contribuye igualmente a la degradación proteolítica de la ciclina por la vía del proteosoma (Koepp et al., 2001; Moberg et al., 2001; Strohmaier et al., 2001). Esta segunda ruta precisa de la fosforilación de diferentes residuos localizados en el seno de la propia ciclina, necesarios para que su interacción con Cdc4, libre o unida a Cdk2, sea posible y pueda de este modo ser ubiquitinada.

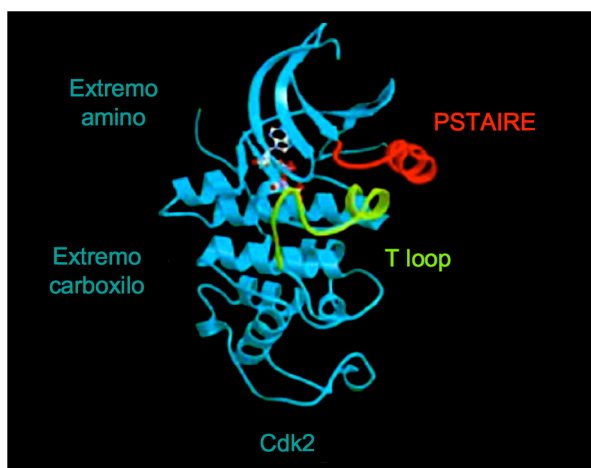
Relegada a un segundo plano, el hueco dejado por la ciclina E empieza a ser ocupado por una nueva familia de ciclinas, las de tipo A (A1 y A2), capaces de asociarse a las quinasas Cdk2 y Cdk1 para formar complejos activos (Girard et al., 1991)(Fig.2). En el creciente y progresivo aumento de los niveles de expresión de la ciclina A, participa una proteína identificada recientemente, denominada Emi1. Este polipéptido es capaz de asociarse a las moléculas adaptadoras Cdh1 y Cdc20 (Hsu et al., 2002; Reimann et al., 2001) bloqueando su interacción activadora con el macrocomplejo APC, ubiquitin ligasa que participa mayoritariamente en la degradación de las ciclinas mitóticas A y B (Fig.2). Esta última, que sucede a la ciclina A presente hasta la transición G2/M, interacciona únicamente con Cdk1, y aunque su presencia se detecta desde las fases S y G2 del ciclo, no es hasta la transición G2/M cuando se vuelve activa (Pines y Hunter 1992). La pérdida de fosforilaciones inhibitorias (Izumi et al., 1992; Kumagai y Dunphy, 1992; Hoffman et al., 1993) y su translocación al núcleo por inactivación de una secuencia de retención citoplasmática (Li et al 1997) permiten a la incipiente asociación ciclina B-Cdk1 empezar a fosforilar un amplio número de sustratos (Malumbres y Barbacid 2005). La ruptura de la membrana nuclear, la condensación cromosómica y la formación del huso acromático, son algunos ejemplos de procesos con implicación directa de la ciclina B (Malumbres y Barbacid 2005) (Fig.2). Finalmente, la activación de APC en la transición metafase-anafase promueve el descenso de los niveles de ciclina B y el decaimiento progresivo de su actividad quinasa asociada, necesarios para la salida de mitosis (King et al 1996; Harper et al., 2002). En este contexto la célula, dependiendo de las condiciones extracelulares, afrontará el inicio de un nuevo ciclo de división mitótica o por el contrario optará por entrar en una fase de reposo o quiescencia.

3.2 Ciclinas dependientes de quinasas: estructura y regulación

Como ha quedado manifiesto en el apartado anterior, las Cdk2 son los motores que gobiernan el devenir de los distintos acontecimientos moleculares que se van sucediendo a lo largo del ciclo de división celular, así como la correcta coordinación espacio-temporal de los mismos. Además, en ciclos celulares complejos, algunas Cdk2 funcionan como importantes sensores intracelulares al integrar las señales que recibe la célula del medio externo, con los propios mecanismos de control del ciclo celular. Entender el funcionamiento de estos mecanismos, implica entender la estructura y regulación de las Cdk2.

Las Cdk2 se definen como subunidades catalíticas con actividad serín-treonín quinasa que presentan una alta homología de secuencia (35-65%) con los prototipos Cdc2/Cdc28 de levaduras y que son capaces de unirse a subunidades reguladoras llamadas ciclinas y/o complementar mutaciones en las mencionadas quinasas Cdc2/Cdc28 (Malumbres y Barbacid, 2005; Vand den Heuvel y Harlow, 1993).

Numerosos estudios cristalográficos han proporcionado una visión tridimensional bastante aclaratoria de la proteína Cdk2 humana, cuyas principales características estructurales son muy probablemente extrapolables a otras Cdk2 (De Bondt et al., 1993; Morgan 1996). Como la mayoría de las proteínas quinasas, Cdk2 presenta un pequeño lóbulo aminoterminal que contiene una estructura en lámina β y el dominio PSTAIRE (conservado en todas las Cdk2 de distintos organismos) con estructura en α hélice, y un lóbulo carboxilo terminal de mayor tamaño donde predomina fundamentalmente la conformación helicoidal (Fig. 3). El ATP se encaja en el surco delimitado por ambos lóbulos, con su base hidrofóbica dirigida hacia el interior de la hendidura, y los grupos fosfatos orientados hacia la apertura de la cavidad.



En su conformación activa, la proteína sustrato se posiciona en la superficie del lóbulo, perfectamente enfrentada al grupo γ -fosfato del ATP. Finalmente, distintos residuos del centro catalítico, entre los que destaca el Asp¹⁴⁵ de Cdk2, conservado en todas las Cdk2 (Meyerson et al., 1992; Hanks et al 1988), dirigen el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la proteína sustrato sobre el fosfato γ del

Figura 3. Estructura tridimensional de Cdk2

ATP. En un estado conformacionalmente inactivo de la Cdk, el bloqueo del acceso de la proteína sustrato al ATP, mediado por una estructura flexible llamada T-loop que emerge del lóbulo C-terminal, así como el incorrecto alineamiento de los grupos fosfato del ATP (por el

posicionamiento del dominio PSTAIRE), impiden que se produzca de forma eficiente la reacción de fosfotransferencia.

Se han descrito 2 mecanismos importantes de regulación de la actividad Cdk (Fig. 4):

1. Interacción proteína-proteína
 - .- Asociación con ciclinas
 - .- Unión con moléculas inhibidoras
2. Modificaciones posttraduccionales
 - .- Fosforilaciones activadoras
 - .- Fosforilaciones inhibidoras

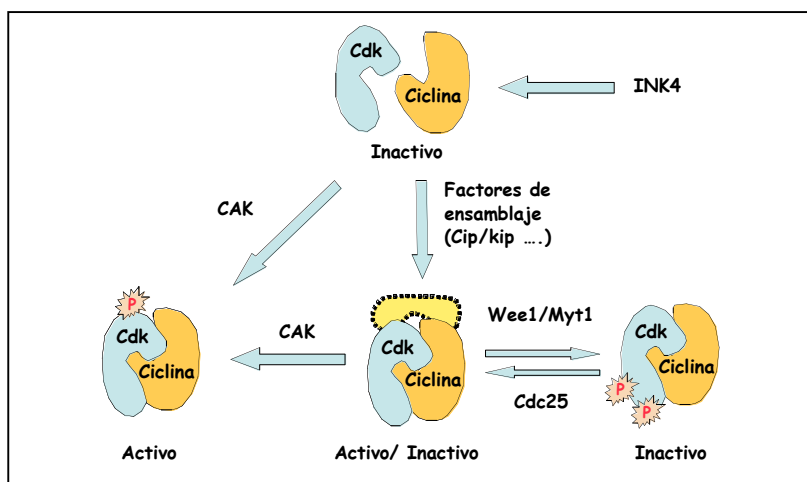


Figura 4. Representación esquemática de diversos mecanismos implicados en la regulación de la actividad Cdk

A pesar de no aparecer referidos en la clasificación anterior, la disponibilidad de las ciclinas, regulada a dos niveles: transcripción y degradación, así como la localización subcelular de los complejos Cdk-ciclina, son otros mecanismos de control no menos importantes. Sin embargo nos centraremos únicamente en el análisis de aquellos que tienen una mayor relevancia desde un punto de vista estructural.

3.2.1 Asociación con ciclinas

Las ciclinas son proteínas de peso molecular variable, entre 30 y 90 kD, capaces de interactuar y activar una o más Cdk. La homología de secuencia entre las distintas ciclinas se concentra en una región de 100 aminoácidos, conocida como **cyclin box**, necesaria para la unión a las Cdk (Kobayashi et al.1992; Lees y Harlow 1993). Distintos grupos han conseguido determinar la estructura cristalográfica de una forma truncada de ciclina A (Fig. 5), en la que se eliminaron 170 aminoácidos del extremo N-terminal a fin de simplificar el dominio de unión a las Cdk (Brown et al., 1995; Jeffrey et al., 1995). Se pudo comprobar que su estructura consistía en un par de dominios centrales, muy compactos, con 5 α hélices cada uno, flanqueados, en las posiciones amino y carboxiterminales, por regiones cortas de estructura helicoidal. Mientras

que la presencia del primero de los dominios, donde se sitúa la secuencia **cyclin box**, es una constante entre las ciclinas, la estructura y posición de las regiones flanqueantes parecen variar más a menudo de unas a otras.

Ya hemos mencionado que la activación de las Cdks requiere, entre otras cosas, la unión con sus respectivas ciclinas. No obstante las características bioquímicas de la interacción Cdk-

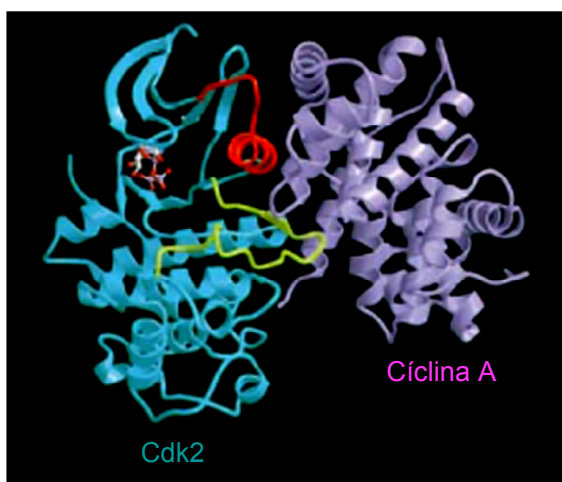


Figura 5. Estructura tridimensional de los dímeros Cdk2-ciclina A

ciclina, en las que subyace este potencial activador de las ciclinas, varían de unos complejos a otros. Mientras que en algunos casos, véase Cdk1-ciclina B, Cdk2-ciclina A y Cdk2-ciclina E, la interacción Cdk-ciclina es lo suficientemente fuerte como para no precisar de ayudas adicionales (Desai et al 1995), en la formación de otros pares Cdk-ciclina se requiere la intervención de factores de ensamblaje, caso de los complejos Cdk4-ciclina D y Cdk7-ciclina H,

o de modificaciones postraduccionales de la subunidad catalítica, por ejemplo Cdk1-ciclina A, que sirven para aumentar la afinidad y fortaleza de las uniones Cdk-ciclina (Desai et al., 1995). La estructura tridimensional del complejo constituido por la forma truncada de la ciclina A y Cdk2 ha arrojado bastante luz sobre los cambios estructurales que se producen en la subunidad catalítica tras su unión con la ciclina y que determinan la activación del complejo (Jeffrey et al., 1995) (Fig. 5). Las principales interacciones que se han visto contribuyen más decisivamente a la formación del par Cdk-ciclina son las registradas entre el dominio PSTAIRE de Cdk2 y las hélices 3 y 5 del dominio **cyclin box** de la ciclina A, así como las que implican al lóbulo C-terminal de la quinasa y a la α -hélice no conservada del extremo aminoterminal de la ciclina. Como consecuencia de todas estas interacciones se producen diversos cambios en la conformación del centro activo de Cdk2 que conducen a una elevación de su actividad catalítica. El más obvio de estos cambios se produce en el T-loop, que deja de ocluir el sitio de unión de la proteína sustrato adoptando una forma aplanada en la entrada del surco. De este modo el residuo Thr 160 queda expuesto al exterior y es susceptible de ser fosforilado por el complejo CAK (quinasa activadora de las Cdks). Otro cambio más acusado si cabe, tiene lugar en el sitio de unión al ATP, donde el cambio posicional que sufre el dominio PSTAIRE conduce a la reorientación de diversos residuos (el Asp¹⁴⁵ es uno de ellos) que posibilita una correcta alineación de los grupos fosfatos del ATP. Si bien muchos de estos cambios estructurales pueden considerarse representativos de las interacciones Cdk-ciclina, otros son propios de cada complejo, lo que explicaría parcialmente la especificidad de sustrato que confiere la subunidad reguladora a la subunidad catalítica.

3.2.2 Interacción con moléculas inhibidoras

Gracias a la obtención de estructuras cristalográficas representativas de ambas familias de inhibidores acomplejados con distintas Cdk, se han podido conocer las razones estructurales del efecto inhibitorio causado por la interacción de estas moléculas (Fig.6). De los inhibidores INK4 se sabe que compiten con las ciclinas D por su unión a Cdk4 y Cdk6 interfiriendo en la formación de los complejos. Pero, ¿cómo consiguen impedir la unión de las ciclinas a las Cdk, base de su mecanismo inhibitorio?

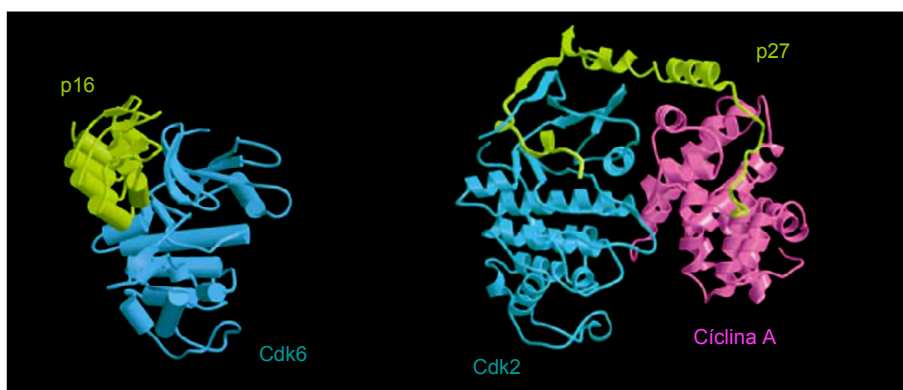


Figura 6. Estructura tridimensional de los complejos binarios Cdk6-p16 y de los trímeros Cdk2-ciclina A-p27

Se ha visto, por estudios cristalográficos, que la unión de p16 a Cdk6 (Fig.6), aunque no llegaría a solaparse con el sitio de unión a las ciclinas, causaría una serie de cambios alostéricos que se propagarían por la estructura de la Cdk, modificando de tal modo la orientación del dominio PSTAIRE y de los lóbulos N y C-terminales (sufren un giro de 15° en relación al resto de la estructura de la Cdk), que la interacción con las ciclinas se vería estéricamente bloqueada (Pavletich et al., 1999).

Respecto a los inhibidores Cip/Kip, se ha identificado en su extremo N-terminal el dominio implicado en la interacción e inhibición de los pares Cdk-ciclina. Se trata de una zona dividida en dos subregiones: una de menor tamaño que participaría en la unión a la ciclina y otra de mayor extensión involucrada en la unión a la subunidad catalítica (Ball et al., 1997; Chen et al., 1996; Fotadar et al., 1996). La obtención de la estructura cristalográfica del complejo ternario Cdk2-ciclina A-p27 ha ayudado bastante al entendimiento del mecanismo inhibitorio empleado por estas moléculas (Russo et al., 1996) (Fig.6). La estructura de p27 presente en el trímero, comprende un segmento de 69 aminoácidos que contiene los dos motivos de unión a la Cdk y a la ciclina. Esta forma truncada de p27 se extiende por la parte superior del complejo contactando a través de su extremo N-terminal con la ciclina y mediante su dominio carboxilo haría lo propio con la subunidad catalítica mediante la inserción en su centro activo de una pequeña α -hélice que bloquea la unión del ATP. La presencia de ATP en el centro catalítico interferiría con la acción de las moléculas Cip-Kip pero no impediría su unión al heterodímero a través del dominio de unión a ciclinas que se produce con una afinidad muy alta. Esto podría

explicar la existencia de complejos triméricos Cdk-ciclina-Cip/Kip funcionalmente activos (LaBaer et al., 1997; Zhang et al., 1994; Harper et al., 1995; Soos et al., 1996).

3.2.3 Modificaciones post-traduccionales

3.2.3.1 Fosforilación activadora

Muchos complejos Cdk-ciclina precisan ser fosforilados en un residuo Thr conservado del T-loop (Thr 160 en Cdk2) para adquirir una activación completa. Esta fosforilación es particularmente importante para los complejos Cdk1-ciclina B, en los que la sola unión de la ciclina no es del todo efectiva en términos de actividad quinasa, o también en el caso del par Cdk1-ciclina A, donde la fosforilación contribuye en gran medida a la interacción entre ambas subunidades (Desai et al., 1995). En el otro extremo encontramos complejos tales como Cdk5-p35 o incluso Cdk7-ciclina H que no necesitan experimentar fosforilación alguna para ser funcionales (Qi et al., 1995; Nigg 1996). Los heterodímeros Cdk2-ciclina A constituyen un caso intermedio. En estos, aunque el principal impacto en la actividad quinasa lo constituye la asociación de la ciclina con la Cdk, un considerable incremento, de hasta 300 veces, se consigue tras la fosforilación.

En eucariotas superiores la fosforilación de este residuo está catalizada por el complejo Cdk7-ciclina H, también denominado CAK (Fig. 4), cuyo ensamblaje requiere la participación del factor Mat-1, si bien la fosforilación en el dominio T-loop de Cdk7 también podría llegar a contribuir a la formación del complejo activo.

3.2.3.2 Fosforilación inhibitoria

La mayoría de las Cdks que controlan el ciclo de división celular sufren fosforilaciones en el residuo Tyr 15 y dependiendo del organismo, también en su inmediato predecesor Thr 14. Estos residuos, ocultos cuando las Cdks se encuentran libres, quedan expuestos y accesibles cuando las subunidades catalíticas se unen a sus respectivas ciclinas. La presencia de grupos fosfato en estos aminoácidos reduce considerablemente, sino del todo, la actividad catalítica de los complejos al alterar muy posiblemente la orientación de los residuos críticos del centro activo o de los grupos fosfatos del ATP.

Estas fosforilaciones inhibitorias juegan papeles decisivos en procesos tales como el inicio de la mitosis o en la parada del ciclo en G2 inducida por daño al ADN. Así, en las fases previas a la mitosis, S y G2 básicamente, los complejos Cdk1-ciclina B se mantienen silenciados gracias a fosforilaciones de los residuos Tyr 15 y Thr 14, catalizadas por las proteínas quinasas Wee1 y Myt1 (esta última sólo en eucariotas superiores) (Mueller et al., 1995; Booher et al 1997; Liu et al., 1997) (Fig.4). La desfosforilación súbita causada por las fosfatasas de la familia Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C), conduce a la activación de Cdk1 y al comienzo de la mitosis (Ohi y Gould, 1999). A su vez, tanto las dos quinasas Wee1 y Myt1, como las fosfatasas Cdc25 están sujetas igualmente a fosforilaciones activadoras o inhibitorias (Fig.2). En respuesta a un daño del material genético, la participación de las proteínas Chk1 y Chk2 fosforilando e inhibiendo las fosfatasas activadoras Cdc25 estabilizaría las fosforilaciones

inhibitorias de Cdk1 impidiendo la entrada en mitosis y otorgando a la célula el tiempo necesario para corregir el daño y poder completar correctamente su ciclo de división (Dasika et al., 1999) (ver más adelante Fig. 9).

3.3 Importancia y función de Cdk2 en el ciclo de división celular

Gran parte del conocimiento que tenemos sobre el control del ciclo celular procede de estudios pioneros realizados en levaduras, cuya menor complejidad organizativa pero relativa proximidad estructural a organismos más complejos y evolucionados, las convirtió en sistemas muy apropiados para el análisis de todos estos procesos. Uno de los primeros pasos dados en este sentido fue la identificación funcional y estructural de una serín-treonín quinasa, denominada p34^{cdc2} en *S.pombe* y p34^{cdc28} en *S.cerevisiae* (Nurse 1975; Nurse y Russell 1986). La participación de esta proteína resultó clave durante las transiciones G1/S y G2/M (Hartwell 1973; Reed, 1980; Nurse y Bisset 1981; Piggot et al., 1982; Booher y Beach 1986; Reed y Wittenberg 1990) a través de su asociación con diversas subunidades reguladoras o ciclinas, cuya síntesis diferencial a lo largo de las distintas fases del ciclo otorgaba a Cdc2/Cdc28 una función específica en cada una de ellas (Moreno et al., 1989; Draetta et al., 1989; Booher et al., 1989; Tsai et al., 1993). En eucariotas superiores se identificó a finales de los 80 una proteína homóloga a Cdc2/Cdc28 que era capaz de asociarse con las ciclinas de la familia A y B, y de complementar mutaciones que inactivaban las quinasas prototípicas de levaduras Cdc2/Cdc28 (Draetta et al., 1987; Lee et al., 1987). De acuerdo con los criterios de nomenclatura acordados recibió el nombre de Cdk1. Al igual que en levaduras, Cdk1 era esencial para el inicio de la mitosis. Sin embargo resultaba dispensable durante la transición G1/S. De hecho varios experimentos apoyaban esta observación. Por ejemplo, en células de ratón, mutaciones termosensibles en Cdk1 conducían, bajo condiciones restrictivas, a una parada del ciclo en G2 (Th'ng et al., 1990; Hamaguchi et al., 1992). De la misma forma, la microinyección de anticuerpos anti-Cdk1 en fibroblastos de rata detenía el ciclo en G2/M (Riabowol et al., 1989). Consecuentemente los vertebrados debían haber desarrollado mecanismos adicionales que regularan otras fases del ciclo, entre ellas la transición G1/S. Todo parecía indicar que, el modelo ya de por sí sofisticado que operaba en levaduras, tendía a complicarse con la participación de más Cdks y ciclinas a medida que ascendíamos en la escala evolutiva. Estas sospechas se confirmaron cuando a principios de la década de los 90 distintos grupos identificaron una nueva Cdk, p33^{Cdk2}, altamente homóloga a Cdc2/Cdc28 y capaz de regularse, como Cdk1, por unión a ciclinas (A y E mayoritariamente) (Elledge et al., 1991; Paris et al 1991; Tsai et al., 1991; Ninomiya-Tsuji et al., 1991). Cdk2 era también capaz de complementar, bajo condiciones no permisivas, mutaciones termosensibles de Cdc28, pero a diferencia de Cdk1, no devolvía la capacidad proliferativa a mutantes Cdc2, mayoritariamente detenidos en G2/M (Ninomiya-Tsuji et al., 1991). Este hecho, unido al hallazgo de una inducción transcripcional más temprana de Cdk2, indicaban que esta proteína podía ser la quinasa responsable de la transición G1/S.

Gracias a la obtención de anticuerpos específicos se determinó el patrón de expresión de Cdk2, Cdk1 y sus ciclinas asociadas en células paradas por privación sérica y estimuladas posteriormente a entrar en ciclo tras la adición de 10% de suero (Tsai et al., 1993). Así se pudo comprobar que la síntesis de Cdk2 era constitutiva en el caso de su forma hiperfosforilada e inactiva, mientras que hacia la transición G1/S se inducía una forma de menor movilidad electroforética correspondiente a la versión hipofosforilada y biológicamente activa de la proteína. Correlacionando con estos resultados de expresión, la actividad quinasa asociada de Cdk2 no se detectaba hasta la fase G1 tardía, precediendo a la síntesis de ADN, para finalmente extinguirse en la fase M temprana. Como era esperable, este intervalo de activación de Cdk2 contenía a los de sus ciclinas asociadas, ciclina E y ciclina A, responsables de la actividad prereplicativa de Cdk2 y de su prolongación en el tiempo hasta las primeras fases de la mitosis, respectivamente.

Además de esta forma inicialmente identificada de Cdk2, denominada isoforma α , una segunda isoforma, designada como β y producto de un procesamiento alternativo, fue descrita en roedores años más tarde (Noguchi et al., 1993; Kotani et al., 1995; Kwon et al., 1998). Sin embargo, se desconoce todavía su importancia biológica y también el motivo de su ausencia en células humanas a pesar de haberse encontrado a nivel genómico la secuencia extra responsable de su síntesis.

A diferencia de Cdk2, la síntesis y expresión de Cdk1 no se inducía hasta bien entrada la fase S prolongándose hasta la metafase mitótica (Furukawa et al., 1990). Este perfil de expresión descartaba a Cdk1 y confirmaba a Cdk2 como la Cdk involucrada en el control de la entrada del ciclo en la fase S. Finalmente, la inhibición de Cdk2 mediante el uso de dominantes negativos, ARN antisentido, ARN de interferencia, microinyección de anticuerpos dirigidos contra Cdk2 o sus ciclinas reguladoras, o por sobreexpresión de moléculas inhibitoras, producía una parada del ciclo en G1 que apoyaba más aún la implicación decisiva de Cdk2 en el control de la transición G1/S (Van den Heuvel y Harlow 1993; Hu et al., 2001; Ohtsubo et al., 1995; Pagagno et al., 1992; Tsai et al. 1993; Polyak et al., 1994; Toyoshima y Hunter, 1994; Kwon y Nordin, 1997; Dirks et al., 1997; Blain et al., 1997; Cheng et al., 1999; Yang et al., 2001; Tetsu y McCormick 2003). Estudios realizados en la mosca de la fruta, *D.melanogaster*, otorgaban a Cdk2 un papel crítico durante el desarrollo embrionario temprano así como, superado este primer defecto, en el crecimiento larvario posterior, lo que subrayaba la importancia de esta quinasa en el organismo vivo, ya pronosticado por las evidencias *in vitro* precedentes (Lane et al., 2000). Como les sucede a todas las Cdk, la actividad quinasa de Cdk2 está sujeta a dos tipos de regulación principales:

- Interacciones proteína-proteína, que son de tipo positivo, en el caso de su asociación con las ciclinas E y A (Pines y Hunter 1990; Tsai et al., 1991; Koff et al., 1992; Tsai et al., 1993) (también se han descrito interacciones con las ciclinas D y B en Xiong et al., 1992 y Tsai et al., 1993 respectivamente), y de tipo negativo, cuando se producen con los inhibidores de la familia Cip/kip

- Modificaciones posttraduccionales en su mayoría fosforilaciones. Las hay activadoras, como la llevada a cabo por el complejo CAK en el residuo Thr 160, e inhibidoras, que afectan a los residuos Tyr 15 y Thr 14 en sendas reacciones catalizadas por las quinasas Wee1 y Myt1. La desfosforilación de estos aminoácidos por las fosfatasas de la familia Cdc25 eliminaría este efecto inhibitorio (Morgan 1997).

El mecanismo por el cual Cdk2 regula la transición G1/S, pasa por la capacidad que posee esta quinasa de fosforilar e inactivar la función represora de la familia de proteínas del retinoblastoma (Rb), que en su estado hipofosforilado y activo se encuentran secuestrando factores de transcripción (los de la familia E2F son los más conocidos) implicados en el control de la expresión de genes necesarios durante las fases S y siguientes. Cdk2, al completar la fosforilación de Rb iniciada en la fase G1 temprana por los complejos Cdk4,6-ciclina D, posibilita la liberación mayoritaria de los factores E2F de los macrocomplejos represores, permitiendo su acceso a las zonas promotoras para la transcripción activa de genes (Sherr, 2000).

Sin embargo, la parada en G1 de células Rb^{-/-} por microinyección de anticuerpos anti-ciclina E, pone de manifiesto la importancia de Cdk2-ciclina E mas allá de la sola fosforilación/inactivación de Rb. De hecho, diversas evidencias vinculan a Cdk2 en el control de numerosos y trascendentes procesos para la célula que iremos analizando a continuación (Lukas et al., 1995, 1996; Koh et al., 1995; Medema et al., 1995; Ohtsubo et al., 1995).

3.3.1 La actividad Cdk2 en el control de la duplicación de los centrosomas

Los centrosomas (Stearns, 2001) son unos orgánulos citoplasmáticos desprovistos de membrana y formados por un par de estructuras cilíndricas, denominadas centriolos, dispuestas perpendicularmente la una con respecto a la otra e integradas por 9 tripletes de microtúbulos que les confieren esa morfología cilíndrica típica.

Ambos centriolos se encuentran embebidos en una matriz densa y fibrilar, denominada material pericentriolar o centrosfera, cuyo principal constituyente es un complejo multiproteico anular formado por una proteína llamada γ -tubulina, que proporciona el molde que dirigirá la síntesis microtubular. Este orgánulo junto con los cromosomas, son los únicos componentes de la célula cuya replicación está perfectamente controlada y coordinada con el ciclo de división celular, evitándose así fenómenos de rereplicación o duplicaciones incompletas que pudieran comprometer la viabilidad de las células. Son precisamente los complejos Cdk2/ciclina los que, por jugar un papel central en el control del ciclo celular, participan muy estrechamente en la correcta coordinación de estos dos procesos.

Son muchos los paralelismos existentes entre la replicación del ADN y la duplicación centrosómica. Ésta se inicia, al igual que aquélla, en la transición G1/S, cuando los dos centriolos empiezan a separarse el uno del otro en un proceso mediado por la actividad quinasa de los complejos Cdk2-ciclina E. Estos heterodímeros fosforilan una proteína llamada

nucleofosmina que se encuentra asociada a la estructura centrosómica (Okuda et al., 2000). La fosforilación de la nucleofosmina promueve su disociación del orgánulo y permite la separación centriolar (Fig.7). La inhibición de la actividad Cdk2 o el uso de un dominante negativo de nucleofosmina resistente a ser fosforilada por los complejos Cdk2-ciclina, bloquea esta primera fase del ciclo (Tokuyama et al., 2001).

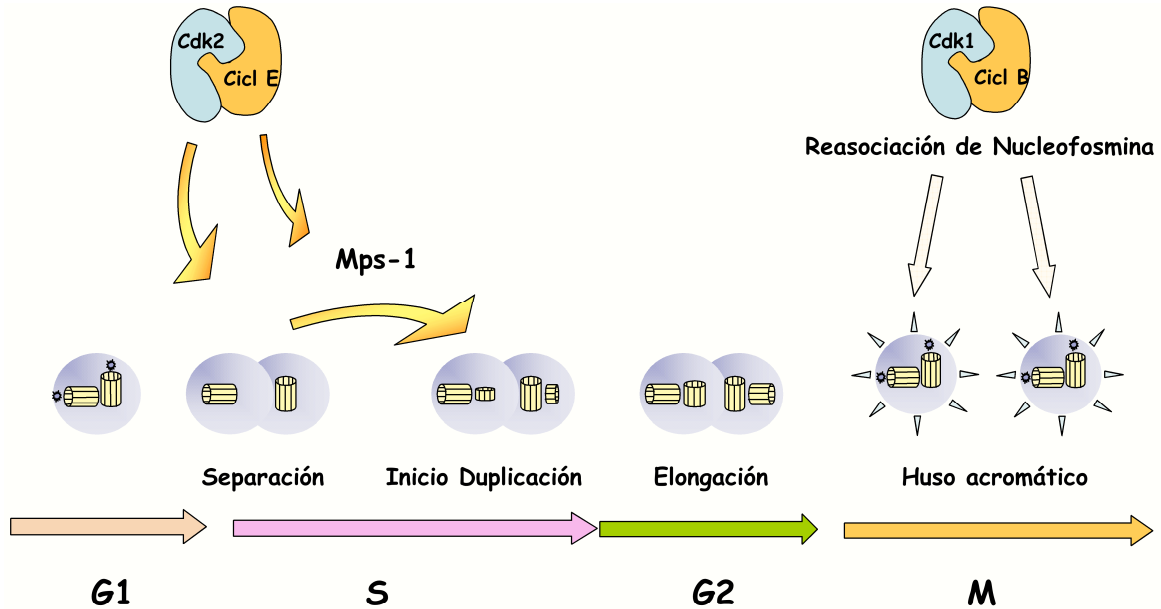


Figura 7. Participación de los complejos Cdk-ciclina en la regulación del ciclo de división centrosomal. Los asteriscos sobre los centriolos representan la proteína nucleofosmina.

Ya en la fase S, a un lado de cada uno de los centriolos y conservando la disposición perpendicular, empieza a surgir un primordio centriolar en un proceso que recuerda bastante a la replicación semiconservativa del ADN (Fig.7). En células de mamífero se ha encontrado una proteína quinasa denominada Mps-1p que participaría en esta fase del ciclo (Fisk y Winey, 2001). Así, se ha visto cómo la sobreexpresión de esta proteína causa repetidas duplicaciones centrosómicas dentro del mismo ciclo de división celular, mientras que la introducción de una forma mutante funcionalmente inactiva impide la replicación centriolar. Los niveles de esta quinasa parecen depender de la actividad Cdk2-ciclina E ya que el bloqueo de ésta, baja dramáticamente los niveles de expresión de Mps-1p que además pierde también su localización centrosómica.

A continuación, en la fase G2 del ciclo, los centriolos sintetizados *de novo* terminan de elongarse, para, finalmente, durante la profase mitótica, producirse la migración de los pares centriolares hacia posiciones diametralmente opuestas de la célula, donde iniciar la formación del huso, clave para la correcta segregación cromosómica (Fig.7). Finalmente a lo largo de la mitosis la nucleofosmina volverá a relocalizarse en los centrosomas en un proceso mediado por los complejos Cdk1-ciclina B. Una duplicación centrosómica aberrante podría desembocar en una incorrecta partición del material genético y conducir a fenómenos de inestabilidad cromosómica observados en muchos cánceres agresivos.

3.3.2 Participación de las Cdk2 en el control de la replicación del material genético

Existen también numerosas evidencias de la implicación de Cdk2, con independencia de su regulación de la actividad Rb, en la replicación del material genético (Tsai et al., 1993; Jackson et al., 1995; Hua et al., 1997; Krude et al., 1997; Duronio et al., 1998; Krude 2000; Furstental et al., 2001; Coverly et al., 2002). Se ha visto que la sobreexpresión de un mutante de Rb insensible a la fosforilación mediada por las Cdk2 detiene el ciclo en la fase G1 impidiendo la síntesis de ADN. Cuando en estas células se sobreexpresa ciclina A o ciclina E, y por tanto se eleva la actividad quinasa asociada a Cdk2, se supera el bloqueo proliferativo y la síntesis de ADN se reanuda con bastante normalidad (Meraldi et al., 1999; Lukas et al., 1997; Alevizopoulos et al., 1997).

Como ya hemos visto en la primera parte de la introducción, sobre los numerosos orígenes de replicación repartidos por todo el genoma empiezan a formarse, durante la fase M tardía y G1 temprana, complejos prereplicativos (Fig.8) que marcan sitios potenciales para el inicio de la síntesis *de novo* de ADN (Diffley et al., 2004; Bell y Dutta, 2002). En la puesta en marcha de este proceso, que requerirá la modificación constante de los complejos prereplicativos a través de la pérdida y ganancia de nuevos componentes, juegan un papel importante los pares Cdk2-ciclina. A través de unos dominios llamados MRAIL, presentes en el extremo aminoterminal de las ciclinas asociadas a Cdk2, estos heterodímeros Cdk-ciclina se asocian a la secuencia RXL de uno de los integrantes de los complejos prereplicativos, la proteína Cdc6. La importancia de esta unión se ha demostrado en extractos de *Xenopus* carentes de Cdc6, en los que la introducción de un mutante portador de un dominio RXL afuncional que bloqueaba su unión con Cdk2/ciclina, fue incapaz de rescatar la replicación fallida de los extractos Cdc6 – (Furstental et al., 2001). Por el contrario la forma silvestre de Cdc6 sí conseguía restablecer la actividad replicativa. Parece por tanto que gracias a esta interacción, los complejos Cdk2/ciclina se situarían en los orígenes de replicación y empezarían a fosforilar distintas proteínas sustrato, orquestando la transformación de los complejos prereplicativos. Uno de esos sustratos es la propia Cdc6 cuya fosforilación promueve la translocación citoplasmática y/o degradación de la proteína (Petersen et al., 1999) (Fig.8). No se descarta que otros componentes del complejo prereplicativo (MCMs, Cdt1...) sufran modificaciones similares con efectos parecidos en la localización subcelular o cambios en su actividad (Bell y Dutta 2002). También la incorporación de nuevos componentes a estos complejos prereplicativos en continua transformación, parece precisar la participación de Cdk2. Distintas observaciones realizadas en levaduras, atribuyen a los complejos Cdk2/ciclina E la responsabilidad del ensamblaje de la proteína Cdc45 (Fig.8) en los orígenes de replicación, necesaria para la formación de los complejos de pre-iniciación e iniciación a través del reclutamiento de diversos factores (PCNA) y ADN polimerasas (ϵ, α, δ) (Zou y Stillman, 2000).

Algunos autores ven en estas fosforilaciones un mecanismo anti-rereplicativo muy eficaz, ya que, por un lado, impediría la formación de nuevos complejos prereplicativos y por otro, evitaría el reencendido de los ya existentes al detonar su activación. Por tanto, los niveles elevados de actividad quinasa durante las fases S, G2 y M serían decisivos a la hora de impedir

fenómenos de rereplicación, manteniendo alejados espacial o temporalmente, a alguno/s de los integrantes de los complejos prereplicativos de sus dianas cromatínicas (Bell y Dutta 2002; Diffley, 2004).

En células que acaban de abandonar la fase de quiescencia, la situación se torna algo diferente. En este caso la presencia de ciclina E (no se sabe si también su actividad quinasa asociada) se hace necesaria para la formación de los complejos prereplicativos (ver discusión).

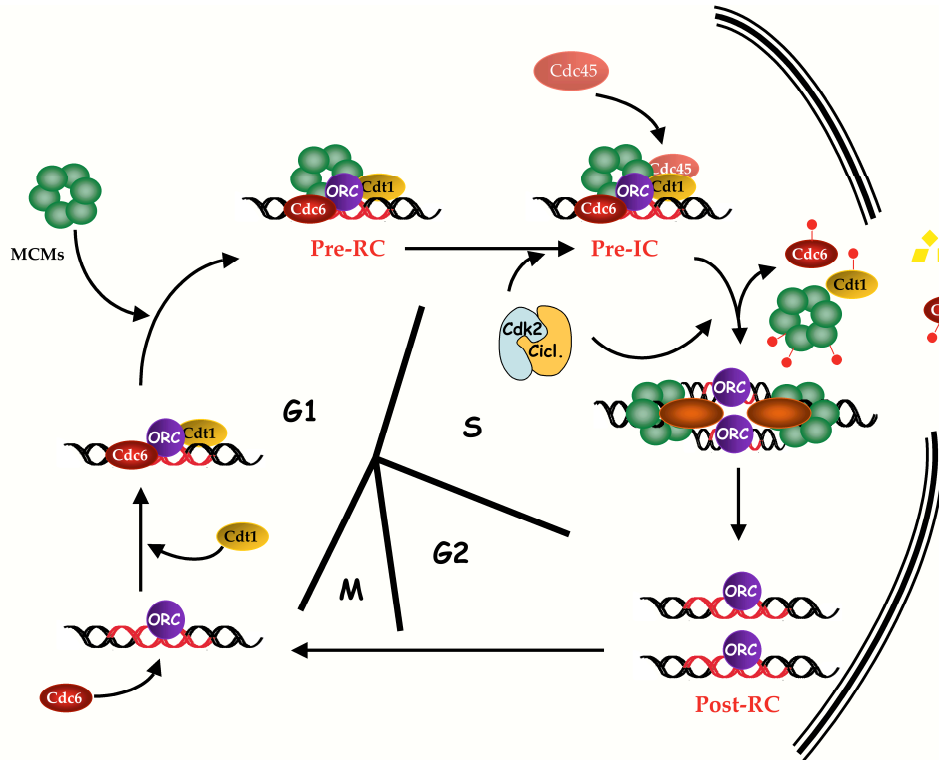


Figura 8. Regulación de la replicación del ADN por los complejos Cdk2-ciclina. Estos dímeros participan en la transformación secuencial de los complejos prereplicativos (Pre-RC) en complejos de preiniciación (Pre-IC), en un primer momento, y, finalmente, en complejos activos aptos para dirigir la replicación del material genético una sola vez dentro de un mismo ciclo de división celular.

Aunque no directamente relacionado con el proceso de replicación *per se*, la actividad Cdk2-ciclina E se sabe que regula la actividad transcripcional del factor NPAT, implicado en el control de la síntesis transcripcional de histonas, cuya activación es fundamental para la correcta organización de la nueva cromatina (Ma et al., 2000; Zhao et al., 2000) .

3.3.3 Otras funciones de Cdk2

El papel de Cdk2 no sólo ha quedado circunscrito a la fase G1/S del ciclo. Diversos trabajos apoyarían también la participación de esta quinasa en el inicio de la mitosis (Guadagno y Newport, 1996; Hu et al., 2001; Mitra y Enders, 2004) e incluso en el control de su salida (D'Angiolella et al., 2001). Finalmente se ha descrito también la participación de Cdk2 durante la activación del punto de control o checkpoint que bloquea el ciclo en G1 como consecuencia del daño producido en el material genómico (Brugarolas et al., 1999) (Fig.9). El correcto funcionamiento de este proceso permite a la célula disponer del tiempo necesario para

reparar mutaciones que de otro modo comprometerían su integridad genética. Así, en presencia de agentes genotóxicos de origen vario, se activan diversas rutas de señalización celular entre las cuales, la integrada por las proteínas ATM,ATR/Chk1,2/p53 juega un papel central (Fig.9). La activación de las serín treonín quinasas ATM / ATR conduce a la fosforilación de p53 que bloquearía su interacción con la ubiquitín ligasa Mdm2 responsable de su degradación. Las quinasas Chk1 y Chk2, también fosforiladas y activadas por ATR y ATM respectivamente, fosforilan y estabilizan p53 contribuyendo a la elevación de sus niveles basales (Fig 9). p53 por su parte induce la transcripción de múltiples genes, entre los que destaca el inhibidor de Cdk2, p21 (El Deiry et al., 1993) (Fig. 9). Mediante la generación de modelos animales defectivos en p53, p21 y ATM, entre otros, se ha confirmado la importancia del papel desempeñado por estas moléculas, ya que su eliminación supone, cuanto menos, la inactivación del checkpoint de G1 (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995; Lane et al., 1992; Xu y Baltimore 1996) . En células normales, la inducción post-irradiación de p21 se correlaciona con la acumulación de Rb hipofosforilado. Un estudio detallado de esta forma hipofosforilada e inactiva de Rb que se acumula en G1, muestra la falta de fosforilación en residuos que se consideran específicos de Cdk2, pero no de aquellos específicos de Cdk4 (Brugarolas et al., 1999).

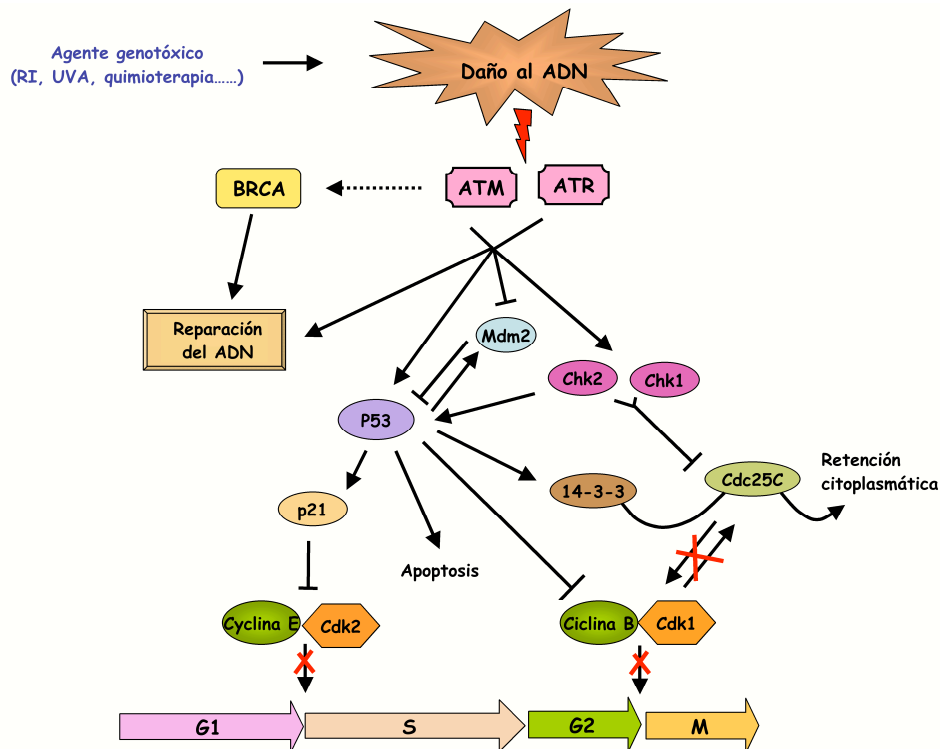


Figura 9. Rutas de señalización celular implicadas en el control de la división celular durante las transiciones G1/S y G2/M en respuesta a un estímulo genotóxico. La activación de las proteínas ATM y ATR permite la estabilización directa o indirecta (mediada por las proteínas Chk1 y Chk2) de p53 que dependiendo del tipo celular, naturaleza del daño..... producirá una respuesta apoptótica o bien de carácter citostático en G1, a través de la inducción de p21 e inhibición de la actividad Cdk2, o G2, mediante la inhibición de los dímeros Cdk1-ciclina B al impedir la translocación nuclear de la fosfatasa activadora Cdc25C. De este modo la célula adquiere tiempo suficiente para llevar a cabo la reparación del daño y asegurar su viabilidad.

Confirmando esta observación, en fibroblastos murinos irradiados, mientras que los niveles de actividad Cdk4 se mantienen comparables a los del control sin irradiar, la actividad quinasa asociada a Cdk2 baja significativamente (Fig. 9). Por tanto, cuando p21 se induce en respuesta a la activación de p53, la actividad Cdk2 se reduce, disminuyendo el grado de fosforilación de Rb, que al conservar gran parte de su actividad represora sobre los factores E2F, bloquea la progresión del ciclo. Aunque en respuesta a otros agentes genotóxicos se ha observado también inhibición de la actividad Cdk4 (He et al., 2005), la implicación de Cdk2 en este checkpoint de G1, es una constante que le otorga un papel central en su regulación.

3.4 Regulación y funciones de los inhibidores Cip/Kip en el ciclo de división celular

Como ya hemos visto, la correcta progresión a lo largo del ciclo celular, vital para el desarrollo normal de los organismos, está regida por la activación secuencial y ordenada de los complejos heterodiméricos Cdk-ciclina. Como quiera que la actividad desregulada de estas holoenzimas es muy a menudo causa de procesos neoplásicos, se hacen necesarios mecanismos de control que regulen de la forma más precisa y segura posible su función. De entre todos ellos, centraremos nuestra atención en el papel desempeñado por una serie de moléculas inhibitoras llamadas CKIs (inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas), que al interaccionar con los distintos pares Cdk-ciclina, frenan su actividad catalítica impidiendo una proliferación celular incontrolada. Hasta la fecha siete CKIs han sido identificados, los cuales en base a su estructura y función se han clasificado en dos familias. La primera de ellas incluye a las cuatro proteínas INK4, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, y p19^{INK4d}, que se unen e inhiben específicamente las subunidades catalíticas Cdk4 y Cdk6. La segunda familia, objeto de este apartado, integra a los tres inhibidores de la familia Cip/Kip, p21^{Cip1} (Harper et al., 1993; El-Deire et al., 1993; Xiong et al., 1993; Dulic et al., 1994; Noda et al., 1994), p27^{Kip1} (Toyoshima y Hunter, 1994; Polyak et al., 1994 a,b) y p57^{Kip2} (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995) cuyo espectro de acción, más amplio que el de la familia INK4, afecta a las actividades de las Cdk asociadas a las ciclinas D, E y A. Estos tres inhibidores presentan una alta homología de secuencia (40-45%) en su extremo amino terminal donde se localiza el denominado dominio inhibitorio de la actividad Cdk (Fig.10). Éste, a su vez, se encuentra dividido en dos subdominios: uno de unión a ciclinas y otro de unión a Cdk, siendo ambos necesarios para una eficiente inhibición de los complejos Cdk-ciclina. A parte de esta región y de las señales de localización nuclear en el extremo C-terminal, los tres inhibidores no comparten más motivos en común (Fig. 10). Así, por su extremo carboxilo terminal, p21, pero no p27 ni p57, contacta con el factor de procesividad de la ADN polimerasa δ , PCNA (Waga et al., 1994; Flores-Rozas et al., 1994), lo que resulta en una inhibición parcial de la replicación del ADN in vitro (Fig. 10). Tanto p57 como p27, pero no p21, presentan unas secuencias carboxiterminales llamadas dominios QT (Matsuoka et al., 1995; Lee et al., 1995), cuyas funciones están todavía por dilucidar (Fig. 10). Finalmente en la región central de la molécula de p57 se han identificado

dos dominios, uno rico en prolinas y el otro con un alto contenido ácido, que al no haber sido encontradas en p21 y p27, conferirían a p57 funciones únicas y específicas (Fig. 10).

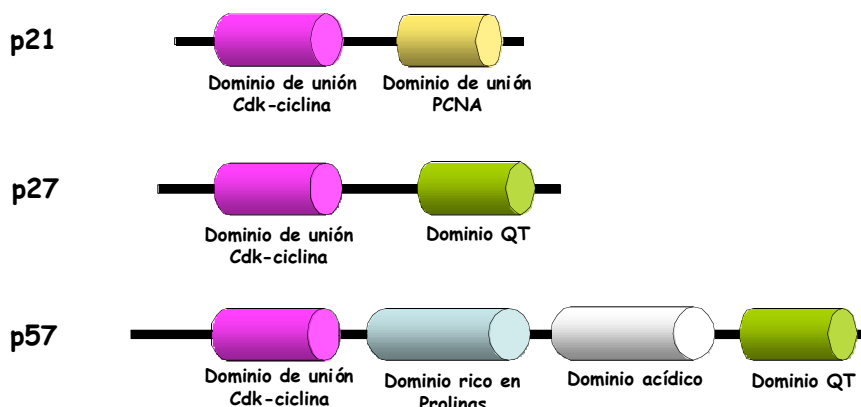


Figura 10. Representación esquemática y comparativa de la familia de inhibidores Cip/Kip

3.4.1 Funciones de los inhibidores Cip/Kip

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión exógena de estos inhibidores así como su inducción endógena, en respuesta a determinadas señales antiproliferativas, conduce a una parada del ciclo celular en G1, los complejos Cdk-ciclina que actúan en la fase G1-S del ciclo parecen, a priori, las principales dianas moleculares de las proteínas Cip/Kip (Toyoshima y Hunter, 1994; Polyak et al., 1994 a,b; Harper et al., 1993; Harper et al., 1995; Matsuoka et al., 1995; Lee et al., 1995). Aunque es unánimemente aceptado el papel inhibitorio de estos polipéptidos sobre los complejos Cdk2-ciclina E y Cdk2-ciclina A, su efecto sobre la actividad quinasa asociada a las ciclinas de tipo D es objeto de controversia. A pesar de haberse demostrado la capacidad inhibitoria de las moléculas Cip/Kip sobre los complejos Cdk4,6-ciclina D, tanto *in vivo* como *in vitro*, diversos estudios señalan que es posible detectar complejos ternarios Cdk4,6-ciclina D-Cip/Kip catalíticamente activos, en condiciones bajo las cuales la asociación de estos mismos inhibidores Cip/Kip con los complejos Cdk2-ciclina E,A bloquea completamente su actividad quinasa (Blain et al., 1997; Zhang et al., 1994; Soos et al., 1996; LaBaer et al., 1997). Así, según dichos estudios, en células proliferando exponencialmente, la mayor parte de la actividad quinasa asociada a ciclina D, se encuentra en complejos que contienen proteínas Cip/Kip (Blain et al., 1997; Soos et al., 1996; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999). De hecho, se han aislado complejos activos ciclina D1,2-Cdk4/6-p21/p27 de un gran número de tipos celulares (Blain et al., 1997; Mahony et al., 1998; McConnell et al., 1999; Parry et al., 1999). Inmunoprecipitados de p27 obtenidos a partir de una amplia gama de extractos asincrónicos de mamífero, resultaron ser catalíticamente activos cuando se usaba Rb como proteína sustrato pero no cuando se empleaba histona H1, que es únicamente fosforilada por dímeros que contienen Cdk2 o Cdk1 (Soos et al., 1996). Sin embargo, si previamente a la inmunoprecipitación de p27, se eliminaban los complejos integrados por Cdk6, la actividad quinasa asociada a p27 desaparecía. Este hallazgo no excluye la posibilidad de encontrar complejos Cdk4,6-ciclina D inactivos que contengan moléculas

Cip/Kip en su estructura. De hecho se ha podido demostrar cómo la asociación supraestequiométrica de p27, mediante la formación de complejos como mínimo cuaternarios, es capaz de inhibir completamente la actividad Cdk4-ciclina D (Blain et al., 1997). La razón que explicaría esta diferencia en el mecanismo de acción de los inhibidores Cip-Kip habría que buscarla muy posiblemente en la estructura cristalográfica del trímero Cdk4-ciclina D-Cip/Kip, que, a falta de su obtención, debería diferir de la del complejo inactivo Cdk2-ciclina A-Cip/Kip.

Esta capacidad mostrada por los complejos Cdk4-ciclina D de resistir la potencial inhibición de las moléculas Cip/Kip, refleja una necesidad más profunda. Algunas investigaciones consideran que la participación de estas moléculas conferiría estabilidad a la unión Cdk-ciclina siendo indispensables para la formación del complejo activo (Cheng et al., 1999; Sugimoto et al., 2002) (Fig. 11b) Análisis bioquímicos realizados en fibroblastos $p21^{-/-}$; $p27^{-/-}$ muestran que la ausencia de estas dos proteínas reduce considerablemente los niveles de expresión de la ciclina D, al acortar su vida media, y produce una reducción de más del 90% en la formación de complejos Cdk4-ciclina D. En consecuencia, la actividad quinasa asociada a estos dímeros se reducía a niveles prácticamente indetectables. Sin embargo, el leve efecto inhibitorio causado en estas células por la sobreexpresión de p16, así como la detección en Rb de residuos específicamente fosforilados por los complejos Cdk4-ciclina D, revelan la existencia de una actividad quinasa residual asociada a la ciclina D. Por otra parte, la sobreexpresión de esta ciclina, aunque capaz de restablecer sus propios niveles de expresión, no conseguía promover la correcta asociación Cdk4-ciclina D ni devolver a la normalidad los índices residuales de actividad quinasa. Este resultado descartaría a los bajos niveles de expresión de ciclina D como posible causa de los fenotipos observados. Finalmente se comprobó que, únicamente la reintroducción de los dos inhibidores ausentes, bien juntos o por separado, revertía todos los fenotipos hasta ahora descritos.

Este modelo, a pesar de su sólida argumentación plantea algunos interrogantes:

- En primer lugar no se entiende la presencia normalizada de complejos Cdk4-ciclina D en distintos tejidos de animales $p21^{-/-}$; $p27^{-/-}$ (Cheng et al., 1999), ni la ausencia de estos complejos en situaciones donde los niveles Cip/kip no serían un factor limitante, como sucede en células quiescentes que sobreexpresan ciclina D (Matsushima et al., 1998). Posiblemente la existencia de mecanismos compensatorios mediados por p57 u otras moléculas aún por identificar, y de modificaciones mitógeno-dependientes explicarían alguna de estas discrepancias.
- Por otro lado llama la atención la falta de correlación entre los fenotipos exhibidos por animales $p21^{-/-}$; $p27^{-/-}$ y animales $Cdk4^{-/-}$; $Cdk6^{-/-}$ (Malumbres et al., 2004) o sus equivalentes $D1^{-/-}$; $D2^{-/-}$; $D3^{-/-}$ (Kozar et al., 2004), dada la falta de actividad quinasa ciclina D asociada a los tres modelos. Es posible que el gran aumento experimentado por la actividad Cdk2 y la remanente actividad Cdk4 que se detectan en los animales $p21^{-/-}$; $p27^{-/-}$, sea suficiente para superar la letalidad embrionaria observada en

ausencia de las tres ciclinas D o de sus quinasas respectivas. La generación de animales $Cdk2^{-/-};p21^{-/-};p27^{-/-}$ podría arrojar algo de luz a este respecto.

- Finalmente las conclusiones que se desprenden de éste y otros estudios, entran en conflicto con los resultados obtenidos por otros grupos. Así en un trabajo realizado también con MEFs dobles mutantes p21/p27, se describe cómo la falta de estos inhibidores, a pesar de seguir causando una reducción tanto en los niveles de ciclina D, como en la cantidad de complejos Cdk4-ciclina D, no supone una pérdida de actividad quinasa (Bagui et al., 2003). De hecho consideran que tanto p21 como p27 son capaces de ejercer su actividad inhibitoria sobre los complejos Cdk4,6-ciclina D dentro de un amplio intervalo de concentraciones, de modo que los trímeros Cdk4-ciclina D-Cip/Kip, son siempre inactivos (Bagui et al., 2000) (Fig. 11a). Así por ejemplo demuestran que la eliminación de estos complejos ternarios mediante ensayos de inmunoprecipitación, no supone una merma de la actividad quinasa asociada a Cdk4. Los defensores de este último modelo sugieren por tanto que los complejos Cdk4,6-ciclina D ejercen sus dos funciones, catalítica, fosforilando Rb, y no catalítica, secuestrando inhibidores Cip/kip, destinando una parte muy minoritaria del reservorio total al cumplimiento de la primera y el resto de mayor cuantía a la segunda (Fig. 11a).

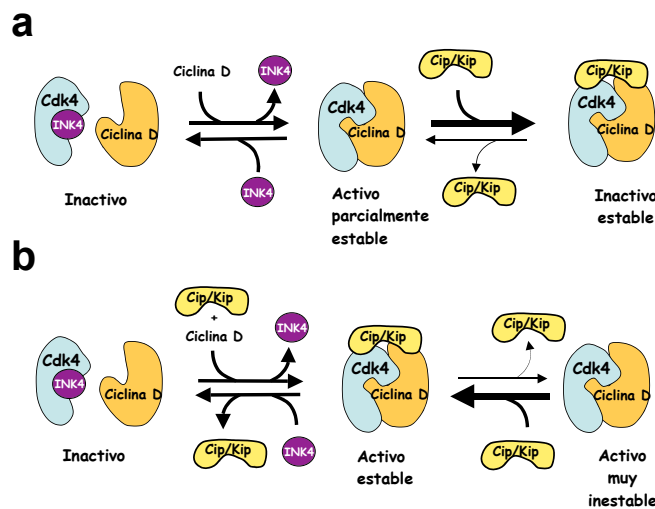


Figura 11. Teorías sobre la función de los inhibidores Cip/Kip sobre los complejos Cdk4,6-ciclina D. a) Los reguladores Cip/kip son siempre inhibidores de la actividad Cdk4,6-ciclina D con los que se encuentran formando complejos ternarios inactivos, estables y mayoritarios dentro de la célula, cuya función consistiría en la activación indirecta de los complejos Cdk2-ciclina E. **b)** La interacción de las quinasas Cdk4,6 con sus respectivas ciclinas precisa de la participación de los reguladores Cip/kip formándose complejos triméricos que además de estables son catalíticamente activos y constituyen el principal reservorio en células creciendo de forma activa.

Obviamente son precisas nuevas aproximaciones experimentales que resuelvan este conflicto.

Hasta hace muy poco, los miembros de la familia Cip/Kip eran considerados proteínas eminentemente nucleares cuya principal función consistía en la regulación de la actividad

quinasa asociada a los complejos Cdk-ciclina. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las proteínas Cip/Kip estarían desempeñando funciones adicionales fuera del núcleo. Así por ejemplo, p21 pasaría a ocupar una localización citoplasmática durante el proceso de diferenciación neural interactuando con las quinasas SAP y ASK con el fin de inhibir su actividad catalítica e impedir una respuesta apoptótica (Asada et al., 1999; Tanaka et al., 2002). Se ha descrito también la interacción de p21 con la procaspasa 3 para inhibir la activación de la caspasa 3 y evitar fenómenos de muerte programada (Suzuki et al., 1998) (Fig.12).

Diversos estudios indican también, que las proteínas Cip/Kip podrían funcionar como cofactores transcripcionales. Se ha visto que p21 a través de su interacción con distintos factores de transcripción y cofactores como E2F, Myc, STAT3 o CBP/300, es capaz de reprimir la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo como ADN polimerasa α , topoisomerasa II, ciclina B y Cdk1 (Kitaura et al., 2000; Coqueret et al., 2000; Snowden et al., 2000; Delavaine y La Thangue, 1999) (Fig 12). También se ha descrito la asociación inhibitoria de p27 al cofactor JAB-1 (Chamovitz et al., 2001). Esta unión promueve la translocación citoplasmática de JAB-1 e impide su interacción con el factor AP-1 inhibiendo su actividad transcripcional y en consecuencia la expresión de genes reguladores de la fase G1 (Fig. 12).

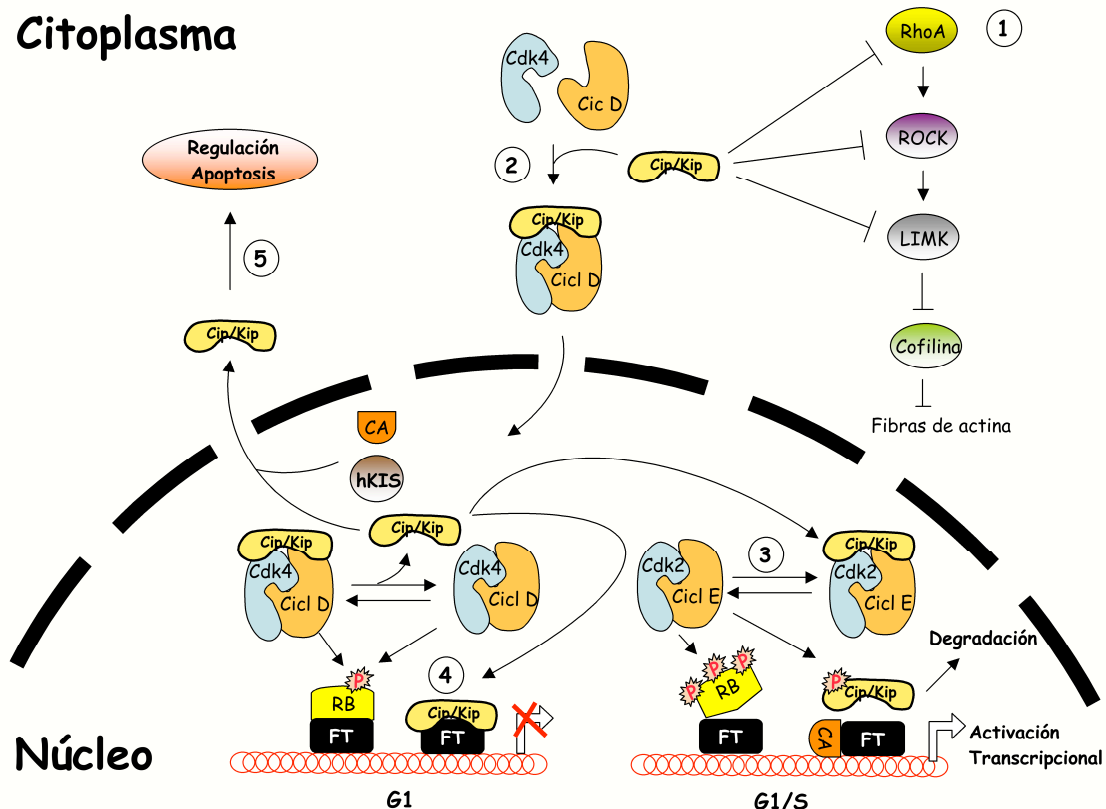


Figura 12. Diferentes funciones de los inhibidores Cip/Kip: migración celular (1), ensamblaje de los complejos Cdk4,6-ciclina D (2), inhibición de la actividad Cdk2-ciclina (3), silenciamiento de la expresión génica a través de la interacción directa con factores de transcripción (FT) o promoviendo el exporte citoplasmático de coactivadores (4) y finalmente regulación de la respuesta apoptótica de la célula (5).

Finalmente hallazgos recientes vinculan la participación de las proteínas Cip/Kip a la regulación de la dinámica del citoesqueleto y migración celular con independencia de su acción inhibitoria sobre los complejos Cdk-ciclina (Denicourt y Dowdy, 2004) (Fig 12). Este proceso está catalizado por la GTPasa Rho A, que en su forma activa, conjugada con GTP, estimula la actividad quinasa de su efector ROCK, que a su vez fosforila y activa a la serín-treonín quinasa LIMK. La fosforilación por parte de esta última de la proteína llamada cofilina, inhibe su actividad despolimerizante de actina y promueve la formación de fibras de estrés y adhesiones focales. Besson et al., muestran que p27 inhibe la activación de RhoA interfiriendo con su unión a GEFs. Para ejercer esta función, p27 es fosforilada en su residuo ser 10 y translocada al citoplasma. También la relocalización citoplasmática de p21 resulta necesaria para la inhibición de la actividad ROCK si bien en este caso el mecanismo de transporte nuclear se desconoce. Finalmente p57 es capaz de bloquear la actividad quinasa de LIMK secuestrándola en el núcleo y alejándola de su sustrato. Por tanto, la inhibición de esta cascada de señalización celular por parte de las moléculas Cip/Kip reduce la formación de fibras de estrés y promovería la migración celular.

3.4.2 Modelos animales de pérdida de función (KO) de los inhibidores Cip/Kip

La generación de modelos animales defectivos en uno o varios inhibidores Cip/Kip, ha mejorado nuestro conocimiento sobre la función biológica llevada a cabo por estas proteínas.

3.4.2.1 Ratones p21^{-/-}

Dada la implicación de p21 en procesos de diferenciación terminal y su papel como efector principal en multitud de respuestas dependientes de p53, se pronosticaba la aparición de un amplio espectro de anomalías fenotípicas tras el silenciamiento del gen que codificaba p21.

En contra de lo esperado, los ratones que carecían de p21 se desarrollaban con total normalidad y no presentaban mayor susceptibilidad neoplásica que los animales control (Deng et al., 1995). Además tanto la respuesta apoptótica como la funcionalidad del checkpoint de G2 inducido por daño a ADN, operaban con total normalidad a diferencia de lo que sucedía en animales carentes de p53 (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995). Por contra, la falta de p21 sí bloqueaba la parada del ciclo en G1 que se producía ante la presencia de agentes genotóxicos, incrementaba la densidad de saturación y acortaba la duración de la fase G1 conduciendo a una entrada prematura del ciclo en fase S (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995; Brugarolas et al., 1998; Martin et al., 2005)

3.4.2.2 Ratones p27^{-/-}

Al contrario que con p21, la eliminación de p27 sí conllevaba un mayor número de alteraciones fenotípicas (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996). Animales sin p27 presentaban un tamaño corporal significativamente mayor que el de sus hermanos control de camada debido a una organomegalia generalizada de carácter hiperplásico que afectaba de forma especial al timo, bazo, pituitaria, retina, médula de la

glándula suprarrenal y gónadas. En la mayoría de estos tejidos la ausencia de otros miembros de la familia Cip/Kip, sobre todo p57, impedía mecanismos compensatorios. Tras descartarse perturbaciones en los niveles hormonales en sangre, se consideró que el incremento detectado en el tamaño corporal y orgánico se debía a una disfunción autónoma del proceso de división celular y no a alteraciones endocrinas.

La muerte de estos animales se producía alrededor del año de edad como consecuencia del desarrollo de tumores de pituitaria de origen intermedio, que a pesar de no resultar invasivos, provocaban, por sus dimensiones, daños al tejido encefálico próximo. Este hecho ponía de manifiesto el papel de p27 como supresor tumoral, si bien el bajo espectro tumoral encontrado minimizó bastante la capacidad oncosupresora atribuida inicialmente a esta molécula.

Tampoco la falta de p27 supuso alteraciones en la respuesta celular a estímulos antimitogénicos, como la privación sérica, la inhibición por contacto o la exposición a rapamicina y TGF β . La puesta en marcha de mecanismos compensatorios explicaría el transcurso normal de estos procesos en un fondo genético desprovisto de p27. Así en células quiescentes carentes de p27, el mantenimiento del estado de reposo se consigue gracias a la participación de la proteína p130 que es capaz de inhibir y silenciar complejos traza Cdk2-ciclina E, presentes en esta fase del ciclo (Coats et al., 1999).

3.4.2.3 Ratones p57^{-/-}

Finalmente la delección de p57, que se expresa a niveles muy altos durante el desarrollo embrionario, si tuvo una repercusión drástica en la organogénesis temprana (Zhang et al., 1997; Yan et al., 1997). La mayor parte de los animales carentes de p57 morían durante el estadio perinatal como consecuencia de complicaciones respiratorias y anomalías esqueléticas debidas a defectos en la osificación de los huesos. Estos animales presentaban además tractos digestivos anormales con pérdida en algunos casos de diversos tramos del intestino delgado. Debido al silenciamiento que sufre el alelo paterno desde los primeros estadios del desarrollo embrionario, los ejemplares heterocigotos que contaban con alelos mutantes de origen materno presentaban fenotipos indistinguibles a los de los animales homocigotos. A pesar de esta elevada mortalidad, un 10% de los animales sobrevivían más allá de la edad del destete aunque no mostraban mayor susceptibilidad neoplásica, lo que a falta de encontrar mecanismos compensatorios, pone en entredicho el papel de p57 como supresor tumoral.

3.5 Implicación de la actividad Cdk2 y de sus mecanismos de regulación en los procesos neoplásicos

El cáncer es un proceso de selección clonal durante el cual las células van acumulando diversas mutaciones, activación de oncogenes o pérdida de genes supresores, que terminan por conferirles una clara ventaja proliferativa sobre su entorno más próximo, e incluso a veces también capacidad invasiva o metastásica.

Una de las dianas objeto de alteración recurrente en el proceso de carcinogénesis, es la maquinaria que controla la división celular y en particular la que gobierna la progresión a través de la fase G1 y durante la transición G1-S. Es en este momento cuando la célula toma la decisión que la compromete de forma irreversible a dividirse o por el contrario a permanecer en un estado de reposo o quiescencia hasta que las condiciones del entorno sean más propicias. Por tanto, un descenso en el umbral de restricción proliferativa impuesto por estos mecanismos de control, incrementaría selectivamente la tasa de crecimiento de aquellas células donde se produce. La identificación de moléculas o procesos alterados en el ciclo de división de células tumorales exige comprender los mecanismos que controlan los ciclos de división de las células normales.

Como ya hemos mencionado a lo largo de toda esta introducción, la progresión a lo largo de las fases G1-S del ciclo, está regulada por diversas serín-treonín quinasas, Cdk6, Cdk4 y Cdk2, las cuales, asociadas con sus respectivas ciclinas y sujetas a rigurosos mecanismos de control, fosforilarían numerosos sustratos. Entre ellos destaca Rb, cuya inactivación, inicialmente catalizada por los complejos Cdk4,6-ciclina D, y posteriormente completada por los dímeros Cdk2-ciclina E, permitirá la expresión de genes requeridos en las fases subsiguientes del ciclo. Si bien la inmensa mayoría de las moléculas implicadas en el control de esta ruta se han encontrado alteradas en cáncer (Malumbres y Carnero, 2003) y son potenciales dianas antineoplásicas, centraremos nuestra atención en la participación de Cdk2 y sobre todo en la de dos de sus principales reguladores: ciclina E y p27 por el importante valor pronóstico que se ha encontrado asociado a ambas moléculas en una amplia gama de tumores.

3.5.1 Cdk2

Aunque la actividad Cdk2 se ha visto alterada en multitud de cánceres humanos, rara vez la causa de esta alteración se encuentra en perturbaciones de los niveles de expresión de la proteína. No obstante, diversos estudios confirman casos de sobreexpresión de Cdk2 en carcinomas orales de células escamosas (SSC), tumores de ovario y carcinomas colorectales correlacionando con una baja tasa de supervivencia e incluso con metástasis (Marone et al., 1998; Li et al., 2001; Mihara et al., 2001). Sin embargo como se ha comentado anteriormente, la desregulación de la actividad Cdk2 se debe fundamentalmente a alteraciones en sus reguladores más inmediatos.

3.5.2 Ciclina E

Se ha encontrado sobreexpresada tanto a nivel de proteína como de ARNm en linfomas, leucemias, sarcomas y en carcinomas de origen tisular diverso (mama, ovario, pulmón, cervix, tracto gastrointestinal y endometrio como más representativos) (Hwang y Clurman, 2005).

Aunque se han descrito casos de amplificación génica en líneas celulares humanas y tumores primarios (Keyomarci y Pardee 1993; Akama et al., 1995; Marone et al., 1998; Casia et al., 2003), el medio más habitual que propicia su acumulación es la alteración de las rutas reguladoras implicadas en el control de su expresión. Así por ejemplo, el gen Cdc4 que codifica

la proteína F-box implicada en la degradación de la ciclina E, se ha encontrado silenciado tanto en líneas celulares cancerosas (Moberg et al., 2001) como en un diverso espectro de cánceres primarios (endometrio, colon y páncreas principalmente) (Spruk et al., 2002; Calhoun et al., 2003; Rajagopalan et al., 2004). Aunque se ha podido correlacionar la ausencia de esta proteína con un aumento en los niveles de ciclina E hipofosforilada y catalíticamente activa, no se puede descartar la concurrencia de otros procesos que impliquen la desregulación de moléculas cuya proteólisis esté catalizada por Cdc4.

Numerosos estudios, en su mayoría realizados en cánceres de mama, otorgan al status de ciclina E un elevado valor pronóstico. Así, diversos autores muestran en sus trabajos altos índices de correlación entre el incremento en los niveles de ciclina E y la menor tasa de supervivencia observada en mujeres con cáncer de mama (Keyomarsi et al. 1994; Porter et al., 1997; Span et al., 2003). Mención especial merece el estudio realizado por el grupo de Keyomarsi (2002), en el cual se refuerza aún más el valor predictivo de la ciclina E a través del análisis de isoformas truncadas de esta ciclina que, según estos autores, serían propios de las células tumorales y tendrían una mayor capacidad catalítica al ser resistentes a la acción de inhibidores Cip/Kip.

Son cada vez más los que piensan que la capacidad oncogénica de la ciclina E no residiría tanto en su actividad promotora de la proliferación celular, sino que estaría más relacionada con fenómenos de inestabilidad cromosómica (Spruk et al., 1999; Minella et al., 2002). Posiblemente un exceso de ciclina E impediría una correcta ejecución de la fase S del ciclo, de modo que la célula entraría en mitosis sin haber completado la replicación de su material genético o con defectos en los procesos de condensación y alineamiento cromosómicos. Otro posible mecanismo de acción lo encontramos en el papel que según muchos juega la ciclina E en la duplicación de los centrosomas. Se ha visto cómo una actividad quinasa desregulada de esta ciclina se salda muchas veces con replicaciones centrosómicas sucesivas dentro del mismo ciclo (Kawamura et al., 2004). Esto conduciría a la formación de múltiples husos mitóticos y, consecuentemente, a segregaciones cromosómicas aberrantes y aneuploidías.

Mediante el uso de distintos modelos animales se ha visto que la capacidad oncogénica de la ciclina E requiere de la concurrencia de otras mutaciones coadyuvantes. Así, animales que sobreexpresan ciclina E en tejido linfóide no desarrollan linfomas, a menos que, o bien reciban tratamiento con el carcinógeno N-metilnitrosourea o bien se silencie la expresión de p27 mediante el cruce con animales p27^{-/-} (Geisen et al., 2003).

3.5.3 p27

A diferencia de otros genes supresores, p27 incumple la regla de Knudson de la doble mutación, según la cual, la inactivación de todo gen supresor precisa del silenciamiento de las dos copias alélicas. p27 ha mostrado esta condición de haploinsuficiencia en numerosos estudios realizados con ratones transgénicos. Así por ejemplo, la aplicación de tratamientos

carcinogénicos o la introducción de mutaciones oncogénicas por cruces con otros modelos animales (delección del gen supresor tumoral PTEN por ejemplo), demostró tener consecuencias tanto más drásticas, en términos de incidencia tumoral, latencia y supervivencia, cuanto más copias alélicas de p27 se perdían (Di Cristofano et al., 2001; Fero et al., 1998).

Éste carácter dosis-dependiente de p27 observado en modelos de ratón es aplicable también, pero con algunas diferencias, a numerosos cánceres humanos (linformas, tumores de próstata, colon, mama, ovario, laringe estómago, glía...) donde la disminución de la expresión de p27, rara vez relacionada con su inactivación genética o epigenética, correlaciona inversamente con la supervivencia del paciente (Lloyd et al., 1999). Se constata por otro lado que en la mayor parte de estos tumores siempre quedan pequeñas cantidades de p27 que no llega a desaparecer por completo, y que podrían estar confiriéndoles ciertas ventajas proliferativas. Esta observación realizada en humanos, ha encontrado también algún equivalente en el ratón, si bien no es lo más normal. De este modo por ejemplo, el epitelio mamario de animales p27^{+/-} resultó ser más susceptible a la transformación inducida por ciertas combinaciones oncogénicas, que el de animales p27^{-/-} (Muraoka et al., 2002). En estudios realizados recientemente, sobre todo con tumores de mama, se ha visto que más determinante aún que la reducción de p27 es su localización subcelular. Así, el peor pronóstico se encontró en aquellos casos en los que p27 se localizaba en el citoplasma (Liang et al., 2002; Shin et al., 2002). Es posible que las células donde esto sucede adquieran una mayor ventaja proliferativa ya que al contar con un p27 puramente citosólico, conseguirían, por un lado, impedir su acción inhibitoria sobre los complejos Cdk2-ciclina nucleares y por otro, favorecer la formación de los complejos Cdk4-ciclina D (que podrían ser exportados al núcleo a través de otros inhibidores Cip/Kip) y propiciar la migración celular a través de la inhibición de la ruta Rho A/ ROCK /LIMK.

Finalmente, vista la infrecuencia de las alteraciones génicas de p27, son principalmente mutaciones en los mecanismos que regulan el procesamiento proteolítico de la proteína, las responsables de las perturbaciones en los niveles de expresión de p27 que se observan en cánceres humanos. Diversos estudios revelan una elevada correlación entre el grado de malignidad de algunos tumores y el aumento y simultáneo descenso en los niveles de Skp2 y p27 respectivamente (Kudo et al., 2001; Latres et al., 2001). Estudios recientes muestran también sobreexpresión de Skp2 en tumores de ovario negativos para el receptor del estrógeno ER y el oncogén Erb2-neu. En estos casos una terapia basada en el uso de inhibidores anti-Skp2 podría ser efectiva. Más aún, se ha observado un incremento progresivo en la acumulación de Skp2 durante el proceso de carcinogénesis oral en el cual la expresión de Skp2 correlaciona con una muy mala prognosis (Kudo et al., 2001). Por último, se han visto efectos sinérgicos entre la sobreexpresión de Skp2 y la presencia de diversos oncogenes como N-ras, H-ras así como con niveles suprafisiológicos de ciclina E (Latres et al., 2001; Gstaiger et al., 2001; Nelsen et al., 2001).

4 OBJETIVOS

1. Estudio *in vivo* de la función de Cdk2: evaluación de sus requerimientos durante el desarrollo embrionario y postnatal del ratón, así como en el proceso de regeneración hepática donde se requiere una reactivación de los mecanismos que gobiernan el ciclo de división celular.
2. Caracterización de la inactivación inducible de Cdk2 tanto en células somáticas normales como en células transformadas, a fin de evaluar la posible puesta en marcha de mecanismos de plasticidad embrionaria.
3. Determinar la contribución de Cdk2 al control de la transición G1/S a través de la caracterización, en un contexto genético desprovisto de esta quinasa, de procesos tan vitales para la célula como la replicación del ADN, la duplicación de los centrosomas y la regulación de la actividad del represor transcripcional Rb.
4. Análisis *in vitro* de las propiedades proliferativas (capacidad de immortalización, inhibición por contacto, salida de quiescencia.....) y de las características bioquímicas (patrón de expresión de distintos reguladores de ciclo, estudio de la actividad catalítica de los complejos Cdk-ciclina) de MEFs deficientes en Cdk2.
5. Determinar la importancia de Cdk2 en el proceso de tumorigénesis tanto *in vitro*, analizando la susceptibilidad de los MEFs Cdk2^{-/-} a la transformación celular inducida por los oncogenes Ras/E1A, como *in vivo*, mediante el uso de modelos tumorales de ratón (estrategia genética) y de protocolos de carcinogénesis en piel (estrategia química).
6. Examinar en ausencia de Cdk2 la funcionalidad del checkpoint de daño ADN que opera en la fase G1 del ciclo en respuesta a distintos agentes genotóxicos (etopósido y radiación ionizante).
7. Estudio genético de la regulación de la actividad Cdk2 por los inhibidores Cip/Kip a través de la generación y caracterización fenotípica de animales y MEFs doblemente defectivos Cdk2^{-/-}; p27^{-/-} y Cdk2^{-/-}; p21^{-/-}.
8. Evaluar el papel desempeñado por Cdk2 y otras Cdk en el mecanismo inhibitorio utilizado por los genes supresores Cip/Kip: impacto de la sobreexpresión de p21, p27 y distintas formas mutantes de ambos inhibidores en la proliferación de células Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-}.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Experimentos *in vivo*

5.1.1 Mantenimiento y genotipaje de los ratones

En todas las colonias de ratones que aparecen descritas a lo largo de esta tesis doctoral, se establecieron dos grupos destacados de individuos: un primer grupo al que llamaremos de envejecimiento, destinado al estudio de la supervivencia de la colonia e integrado por un número equivalente de machos y hembras, y un segundo grupo, formado por animales reproductores jóvenes, encargado del mantenimiento y/o expansión de la colonia así como de la producción más o menos periódica de embriones utilizados para la extracción de MEFs. A medida que los ratones de la cohorte de senescencia van muriendo, de forma espontánea o tras ser eutanasiados, se les practica una necropsia basada en la recogida sistemática de diversas muestras tisulares (músculo, piel, hígado, páncreas, bazo, riñón, glándula suprarrenal, colon, estómago, gónadas, pulmón, corazón, timo, grasa blanca, encéfalo, pituitaria, ojos y hueso son las muestras más comúnmente recogidas). Éstas, una vez fijadas y debidamente procesadas son sometidas a un riguroso análisis anatomohistopatológico.

El genotipaje de los ratones se hizo de forma rutinaria por extracción de ADN de las colas de los ratones y tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) basada en el diseño de oligonucleótidos que nos permitan en cada caso un diagnóstico diferencial del genotipo de los ratones. Para el genotipaje de los ratones defectivos en *Cdk2* y en el caso de aquellos portadores de la mutación condicional se utilizaron de rutina los siguientes oligonucleótidos: F6: 5' CAAGTTGACGGGAGAAGTTG 3'; IN1R3: 5' ACGAACAGCCCTGGACCCCTC 3' y IN3R3: 5' GCGATAAGCTTCGAGGGACC 3'. La combinación F6 / IN1R1 amplificaba una banda de 300 pb correspondiente al alelo silvestre mientras que la combinación F6 / IN3R3 hacía lo propio con la forma mutante de *Cdk2* produciendo también una banda de 300 pb por lo que fue necesario realizar dos reacciones de PCR diferentes. En el caso de los animales defectivos en p21, p27 y p53 se utilizaron las siguientes combinaciones de oligos:

p21:

1. p21+116F : 5' AAGCCTTGATTCTGATGTGGGC 3'
2. p21-135 : 5' TGACGAAGTCAAAGTTCCACCG 3'
3. Neo 19+: 5' GCTATCAGGACATAGCGTTGGC 3'

Los dos primeros amplifican una banda de 900pb correspondientes al alelo silvestre mientras que la combinación de los oligos 1 y 3 genera una banda de 700 pb correspondiente al alelo mutante.

p27:

1. FP-27: 5'GATGGACGCCAGACAACC 3'
2. RP-27: 5'CTCCTGCCATTTCGTATCT 3'
3. P27.1: 5'TGGAACCCTGTGCCATCTCTAT 3'
4. P27.2: 5'CCTTCTACTGCCTTCTTGACG 3'

El uso combinado de los dos primeros oligos genera una banda de 190 pb correspondiente al alelo silvestre mientras que la combinación de los dos últimos amplifica una banda de 600 pb (alelo -) .

p53:

1. IMR037: 5' TATACTCAGAGCCGGCCT 3'
2. IMR036: 5' ACAGCGTGGTGGTACCTTAT 3'
3. IMR038: 5' CTATCAGGACATAGCGTTGG 3'

Los oligos 1 y 2 producían una banda de 400 pb indicativa del alelo silvestre mientras que la combinación 1 y 3 generaba una banda de 700 pb que correspondía al alelo mutante.

MMTV- Nras:

1. MMTV-l: 5' ACAGGGACCCTCGGATAAGT 3'
2. MMTV-r: 5' GGATTAGCTGGATCGTCAGG 3'

Estos dos oligos daban como resultado una banda de 230 pb cuando el animal era portador del transgen mientras que en los ratones silvestres no se detectaba banda alguna.

5.1.2 Hepatectomías parciales

Se usaron 20 animales por genotipo, de 2-3 meses de edad y con idéntico número de machos que de hembras a fin de minimizar la variabilidad inherente al experimento. Tras ser anestesiados por inhalación de isoflurano, se realizó la resección quirúrgica del 70% de la masa hepática siguiendo el protocolo descrito por Higgins y Anderson (1931). Terminada la operación, cada animal recibió por vía subcutánea una dosis del analgésico Buprex, administrado en intervalos de 12 horas durante los 4 días siguientes a la intervención. Los lóbulos extirpados (punto cero del experimento) se pesaron y congelaron a -80°C para análisis posteriores. Los ratones intervenidos se sacrificaron a distintos tiempos post-hepatectomía (24h, 36h, 48h, 72h y 9 días), a razón de 4 animales por punto, y después de haber recibido 2 horas antes de la eutanasia una inyección intraperitoneal de BrdU (100 $\mu\text{g/g}$). En cada tiempo se recogieron muestras de hígado regenerante para proteína, ADN e histología y en el caso particular del último de los puntos, cuando se supone que la regeneración ha finalizado, se determinó el peso del hígado remanente para poder cuantificar la respuesta regenerativa.

5.1.3 Tratamiento con 4 OHTamoxifén

El 4OHT tiene una estructura química de tipo esteroídico por lo que únicamente es soluble en disolventes orgánico (acetona, etanol, cloroformo... etc). Estos solventes nunca pueden ser utilizados como vehículo en la administración intraperitoneal por los importantes efectos tóxicos que desencadenan. Para la administración del 4OHT recurrimos a la preparación de una suspensión del mismo en aceite de maíz utilizando para ello un sonicador. Esta preparación es bastante inestable por lo que se debe reconstituir de nuevo, por sonicación, antes de cada administración.

Cada uno de los animales sujetos a este tratamiento recibió por vía intraperitoneal un total de 3 inyecciones semanales de 0,5 mg cada una a lo largo de 4 meses.

5.1.4 Tratamientos con carcinógenos (DMBA/TPA) y análisis de mutaciones

A los 12 días de edad se afeitaron las espaldas de todos los animales sujetos a tratamiento y se les administró por vía tópica una única dosis de 0,5 mg de DMBA disuelto en 100 μ l de acetona. La progresión tumoral se estimuló por el tratamiento con 7,5 μ g de TPA en 100 μ l de acetona 2 veces por semana durante 3 meses. Desde el momento de la aparición de los primeros papilomas se realizó un seguimiento pormenorizado de su evolución en número y tamaño para cada ratón en particular.

Análisis de mutaciones: el análisis del status relativo al codon 61 del gen H-ras se realizó a partir del ADN aislado de papilomas de los diferentes genotipos analizados. Mediante tecnología de PCR se consiguió la amplificación del exón 2 de H-ras que contiene el codon 61. El producto de PCR se secuenció y se analizaron los correspondientes histogramas con el fin de detectar la presencia de mutaciones. Oligonucleótidos usados para la amplificación: *H-ras* exón 2: 5'-CCCCACTAAGCCGTGTTGTTTGC-3', 5'-TCAGTGTGCACACGGAACCTTCCT-3'

5.2 Ensayos *in vitro*

5.2.1 Preparación de fibroblastos embrionarios y condiciones de cultivo

Los experimentos realizados en este trabajo de investigación se han basado en la utilización de MEFs (*Mouse embryonic fibroblast*) obtenidos a partir de embriones (E13,5). Los embriones fueron extraídos del útero materno y separados del saco vitelino, eliminándose el hígado y la cabeza, ésta última usada como fuente de ADN para el genotipaje del embrión. El resto fue sometido a una primera disgregación mecánica con la ayuda de un bisturí y a continuación a una disgregación enzimática por tratamiento de cada embrión con 3 ml de solución de tripsina-EDTA (GibcoBRL) durante 10 minutos a 37°C. La suspensión de células procedente de cada embrión se sembró en una placa de 150 mm de diámetro y cuando el cultivo alcanzó el 70% de confluencia (2-3 días después) las células se recogieron y se congelaron en N₂ líquido. Se consideró pase 1 de estas células el momento en que fueron puestas en cultivo después de la descongelación.

Los cultivos de MEFs se mantuvieron en DMEM con 4500 mg/l de glucosa (GibcoBRL) suplementado con antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 10% de suero bovino fetal (*foetal bovine serum*, FBS).

Para conseguir una escisión completa del alelo condicional, MEFs Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert} fueron tratados con 4OHT (600nM) desde el mismo momento en que se pusieron en cultivo y hasta el día de su congelación. Aunque la inactivación completa de Cdk2 ocurría 6 días después de iniciarse el tratamiento, optamos por una presencia continuada de 4OHT en el medio de cultivo para asegurarnos la generación de líneas celulares puras.

5.2.2 Ensayos de proliferación celular

Ensayos de immortalización: los ensayos de immortalización se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Todaro y Green en 1963 basado en el cultivo seriado de los MEFs. Así, a pase 2 se sembraron 10^6 células por placa de 10 cm manteniéndose en cultivo durante 3-4 días. Transcurrido este periodo de tiempo (designado como pase) se contó el número de células resultante de las divisiones acumuladas durante esos días, volviéndose a plaquear nuevamente 10^6 células. Este proceso se repitió tantas veces cuantas fue necesario para que las células superasen la fase de crisis y adquirieran nuevamente la capacidad de proliferación exponencial propia de cultivos primarios durante los pases iniciales de crecimiento. Cuando se comprobó que dicha proliferación exponencial persistía en el tiempo durante 2 o 3 pases, consideramos que la immortalización celular se había producido y estabilizado con éxito, procediéndose finalmente a la congelación del cultivo. En las gráficas que se muestran en el apartado de resultados aparece representado en escala logarítmica el número acumulado de células, que se calculó como el producto entre, la tasa de crecimiento (cociente obtenido de dividir el número de células contadas en un determinado pase entre el número de células sembradas en el pase anterior) y el número inicialmente plaqueado de células en el caso del primero de los pases o el número acumulado precedente, en el caso de los pases subsiguientes.

Curvas de crecimiento: Se realizaron sembrando 5×10^4 células (primarias o inmortales, dependiendo de los casos) por pocillo en placas de 6 pocillos y por duplicado (para cada punto y clon), llevándose a cabo contajes diarios durante 4-6 días. A lo largo de ese tiempo y durante una o dos veces, se procedió al cambio de medio a fin de mantener las condiciones de proliferación lo más óptimas posibles.

Curvas de densidad de saturación: Con el objeto de evaluar la funcionalidad de la inhibición por contacto, se plaquearon, también por duplicado, 2×10^5 MEFs primarios en placas de 10 cm y se mantuvieron en cultivo durante 12 días, en el transcurso de los cuales se cambió el medio de forma periódica, realizándose hasta un total de 4 contajes.

Ensayo de eficiencia de plaqueo: Este experimento, que permite analizar desde otra perspectiva la capacidad immortalizante de un determinado cultivo celular, se realizó sembrando MEFs primarios a muy baja densidad (2000 y 5000 células) en placas de 10 cm. Al cabo de 3-4 semanas en crecimiento, durante las cuales el medio de cultivo se cambió de forma regular, muchas de estas células, tras repetidas divisiones, eran capaces de generar colonias que se hacían visibles mediante la tinción del cultivo con azul de metileno (3% en metanol). Finalmente se procedió al contaje de aquellas colonias cuyas dimensiones superaban los 3 mm de diámetro.

Entrada en fase S: Para analizar la cinética de entrada en fase S, se sembraron en placas de 10 cm 5×10^5 MEFs primarios que se mantuvieron en cultivo con suero 0,1% durante 72 horas a fin de favorecer la sincronización celular en G0. Al cabo de los 3 días se forzó la entrada de estas

células quiescentes en el ciclo celular, mediante la adición de medio con 10% de suero, recogiendo muestras a distintos tiempos post-estimulación que se sometieron posteriormente a distintos tipos de análisis bioquímicos y citométricos. En algunos casos se aplicó un pulso de BrdU (50 μ M) 1 hora antes de la recogida de las células.

5.2.3 Ensayos de formación de focos

La expresión ectópica de H-ras (control negativo) y de la combinación oncogénica formada por el tándem H-ras y EIA se realizó mediante la transfección con lipofectamina de MEFs primarios creciendo exponencialmente en placas de 10 cm y con una densidad próxima a la confluencia (70-80%). Al día siguiente de la transfección, el cultivo se partió 1:2 y se mantuvo en crecimiento durante 3-4 semanas al cabo de las cuales era evidente en alguna de las placas la aparición de pequeñas formaciones focales de aspecto nacarado. Como se contaba con duplicados, una de las placas se utilizó para el aislamiento de focos individuales que, una vez expandidos, permitieron establecer distintas líneas celulares transformadas cuyas propiedades proliferativas fueron analizadas. La segunda de las placas se tiñó con azul de metileno y sirvió para realizar un análisis cuantitativo del experimento.

5.2.4 Transfecciones e infecciones retrovirales

La introducción de ADN exógeno por transfección se realizó con lipofectamina, producto de carácter anfipático capaz de formar pequeñas vesículas o micelas alrededor del ADN plasmídico, permitiendo la entrada de éste en el medio intracelular al fusionarse la envuelta micelar con la membrana lipídica. Las células diana deben sembrarse a altas densidades y en ausencia de antibióticos (para evitar la toxicidad de la lipofectamina) un día antes de realizarse la transfección. Las cantidades de lipofectamina y ADN que se usaron en todos los experimentos mostrados son de 30 μ l y 12 μ g respectivamente por reacción de transfección y para una placa de 10 cm.

Por su parte, la generación de retrovirus requiere el uso de unas líneas celulares empaquetadoras donde se lleva a cabo la encapsidación y producción vírica. En nuestro caso utilizamos unas células derivadas de la línea de riñón humana 293T, denominadas phoenix que ya contenían en su genoma los genes de empaquetamiento (env, cap y pol). Estas células son transfectadas, mediante el protocolo descrito anteriormente, con 12 μ g de ADN plasmídico integrado por cantidades equivalentes del vector retroviral p-Babe vacío o portador de cada uno de los genes de interés (p21, p27, p27^{3M}, p27^{F64A}, p21 ^{Δ PCNA}) y un plásmido que contiene los genes ecotrópicos de encapsidación a fin de aumentar la eficiencia del proceso. Al día siguiente, las células se pasan a incubadores de 32 °C para favorecer la estabilidad de los retrovirus en el medio de cultivo, permaneciendo a esta temperatura entre 36 y 48 horas. Un día antes de la transducción, los MEFs receptores de la descarga viral son plaqueados a no muy alta densidad (10⁶ células por placa de 10 cm) a fin de permitir una proliferación celular activa necesaria para que la integración del retrovirus ocurra con eficiencia. A las 48 horas post-transfección, el sobrenadante de las

phoenix que contiene las partículas víricas, se recoge y centrifuga para eliminar posibles trazas contaminantes de células empaquetadoras. Después es añadido a los MEFs en cultivo (4ml de sobrenadante por placa de 10cm) junto con polibreno (8µg/ml-12µg/ml, Sigma) que favorece la agregación e infectividad de los retrovirus. Tras una incubación a 32°C de 12-16 horas se cambia el medio de cultivo y se pasan las placas a incubadores de 37°C. Transcurridas 36-48 horas comienza el proceso de selección cuya duración dependerá del antibiótico utilizado. Así, en presencia de puromicina (2 µg/ml), 2 días son suficientes para poder trabajar con una población celular altamente enriquecida en células infectadas. Con higromicina (50 µg/ml) y neomicina (400 µg/ml) el tiempo de selección aumenta en casi 5 días. Finalmente las células se recogen para someterlas a distintos ensayos bioquímicos, proliferativos y de citometría. En muchos casos, 7-9h antes de su recogida fue aplicado un pulso de BrdU (50 µM)

5.2.5 Irradiación y tratamiento con etopósido

Cultivos de MEFS creciendo tanto sincrónica como asincrónicamente fueron irradiados en suspensión con una dosis de 10 Gys y a continuación sembrados nuevamente en placas de 10cm a una densidad comprendida entre el 40 -60% de confluencia. En este momento se dió un pulso de BrdU (50 µM) que finalizó cuando se recogieron las células 24h más tarde. Finalmente, por citometría de flujo se analizó la distribución de las distintas poblaciones celulares recogidas.

En el caso del tratamiento con etopósido, MEFs en crecimiento exponencial fueron tratados durante 24 horas con una concentración de etopósido de 50 µM. A continuación lavamos con PBS varias veces y añadimos medio fresco al cultivo. Al día siguiente recogimos las células para realizar los ensayos biológicos pertinentes.

5.2.6 Citometría de flujo e inmunotinción de células marcadas con BrdU

MEFs marcados o no con el análogo estructural de la timidina, BrdU (usado a una concentración de 50 µM y con un tiempo de exposición variable según el experimento) fueron recogidos y fijados con etanol al 70%. En estas condiciones las células pueden conservarse a -20 °C durante varias semanas hasta ser finalmente procesadas más adelante. Si tan sólo interesa analizar la distribución de las distintas poblaciones celulares a lo largo de las fases del ciclo, bastaría realizar una tinción con yoduro de propidio (50 µg/ml) en presencia de 0,5 mg/ml de ARNasa, previo lavado con PBS a fin de eliminar restos de etanol. Si además se requiere la detección de células en proliferación activa por incorporación de BrdU, habría que realizar varios pasos previos a la tinción con el agente intercalante (yoduro de propidio). Así, en un primer momento las células son permeabilizadas durante 30 min y a temperatura ambiente en presencia de pepsina (0,2 mg/ml) y HCl (0,2N). Después la acidez del HCl es neutralizada con 0,1M de tetraborato sódico pH 8,5 y a continuación las muestras son bloqueadas en una solución que contiene suero murino. Finalmente las células se incuban durante 30 min a 25°C con el anticuerpo primario (Pharmingen) diluido 1:5 en la solución de bloqueo. Como el anticuerpo está conjugado

con un fluorocromo no se requiere el uso de ningún secundario. Entre incubación e incubación se recomienda la realización de al menos un lavado con PBS.

Por último las muestras celulares procesadas como hemos visto y en base a su contenido en ADN, fueron analizadas por el citómetro de flujo a través del programa Cell Quest Pro.

5.2.7 Detección y cuantificación de centrosomas por inmunofluorescencia

Células en cultivo asincrónico fueron permeabilizadas durante 1 minuto con 0,1% de tritón X-100 en los mismos pocillos donde se encontraban creciendo y que aparecían dispuestos sobre un portaobjetos en el que se realizó el montaje de las preparaciones al final del proceso. Tras la permeabilización, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 30 minutos y a continuación se bloquearon con 10% de suero murino a lo largo de 45 minutos. Finalmente se realizaron dos incubaciones consecutivas de 1 hora de duración cada una, primero con el anticuerpo que reconocía la proteína centrosómica γ -tubulina (SIGMA) y a continuación con el anticuerpo secundario correspondiente (Molecular probes). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y entre ellas se practicaron de 2 a 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno. Antes del montaje con moviol, las muestras se incubaron 2 minutos con DAPI para permitir la visualización de los núcleos. Por último se contaron centrosomas de 200 células correspondientes a cada uno de los genotipos analizados.

5.2.8 Extracción de ADN y proteínas

La extracción de ADN de las distintas muestras empleadas en este estudio se realizó mediante digestión del tejido o de las células con proteinasa K a una concentración final de 400 $\mu\text{g/mL}$ durante 12 horas a 55°C. Tras el tratamiento de las muestras con una solución saturada de cloruro sódico, el ADN se precipitó con isopropanol y se resuspendió en el tampón TE.

Las proteínas se extrajeron lisando las células en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) que contiene NaCl 150 mM, NP-40 0,5% e inhibidores de proteasas (PMSF 100mM más una mezcla encapsulada de otros inhibidores) y de fosfatasas (Vanadato sódico 100mM y NaF 1 mM). Tras la lisis, los extractos proteicos fueron sonicados de 5 a 10 segundos e incubados en hielo durante 15 minutos. A continuación las muestras se centrifugaron 12 minutos a 13000 rpm para eliminar los restos no digeridos y finalmente, antes de congelarse a -80°C, se procedió a su cuantificación por Bradford.

5.2.9 PCR convencionales

Las PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de este estudio se realizaron en un volumen de 20 μl , siendo la composición de la mezcla de reacción la siguiente: 250 μM dNTPs, 1.5 mM MgCl_2 , 2 μl de tampón de reacción 10x, 1 μl de taq polimerasa, 500 nM de cada oligonucleótido y 1 μl de ADN molde.

5.2.10 Western blot

Entre 30-40 μg de proteína, debidamente preparados (Harper et al 1993) y obtenidos a partir de los distintos extractos proteicos de interés, fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados y finalmente incubados con anticuerpos dirigidos contra: Cdk1, Cdk2, Cdk4, ciclina D2, ciclina A, Ciclina E, p53, p21, p16, p27, ERK y tubulina. Finalmente y tras una segunda incubación en presencia de los anticuerpos secundarios apropiados, la visualización de las proteínas se realizó con ECL (Amersham) usando distintos tiempos de exposición en función del anticuerpo.

5.2.11 Inmunoprecipitación y ensayo quinasa

En ambos casos se parte de muestras de 500 μg de proteína que se incuban durante toda una noche en presencia de distintos anticuerpos dirigidos contra las proteínas: Cdk1, Cdk2, Cdk4, ciclina E, Ciclina A y contra el epítipo Flag. Al día siguiente se realiza una segunda incubación de 3-4 horas con bolitas de sefarosa unidas a proteína A en las que quedan inmovilizados los complejos antígeno-anticuerpo. A partir de este punto ambos ensayos divergen en el proceder. En el caso de las inmunoprecipitaciones se realizan 3 lavados con el mismo tampón usado para la extracción de las proteínas, NP40. Después, y tras añadirse el buffer de carga a las bolitas de sefarosa que contienen los inmunocomplejos, las muestras se hierven durante 4 minutos, se centrifugan a 5000 rpm durante un breve espacio de tiempo, 5-6 minutos, y finalmente se someten al protocolo de western blot descrito con anterioridad. Por lo que respecta a los ensayos quinasa, el último de los 3 lavados se realiza con un tampón especial (20mM Tris HCl pH 8, 10mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1mM DTT) que es donde se prepara también la mezcla de reacción, consistente en: 1 mM de ATP frío, 10 μCi de $\gamma^{32}\text{P}$ dATP y 0,5-1 μg del sustrato de fosforilación adecuado: Rb (Sta. Cruz) o histona H1 (Roche). Dicha mezcla se añade a cada una de las muestras realizándose una incubación de media hora a 30° C transcurrida la cual se detiene la reacción mediante la adición de SDS. Finalmente se hierven los inmunoprecipitados no más de 5 min, se centrifugan para la eliminación de las bolitas de sefarosa y por último se someten a una electroforesis en gel de poliacrilamida. Tras una breve exposición se visualiza la señal radiactiva correspondiente a los sustratos fosforilados por los inmunoprecipitados que se puede cuantificar mediante un análisis de PhosphorImager.

5.2.12 Southern blot

20 μg de ADN genómico de células o tejidos se digiere toda la noche con la enzima de restricción BamHI. Al día siguiente el producto de la digestión se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Posteriormente se realizan 3 lavados consecutivos del gel (primero con 0,25 N de HCl, segundo con una solución desnaturalizante: 1,5 M NaCl / 0,5 N NaOH y tercero con una solución neutralizante: 1,5M NaCl/ 0,5M tris-HCl pH 7,4) antes de realizarse la transferencia por capilaridad a una membrana de nylon en un proceso que se prolonga durante toda la noche. A

continuación, el filtro de nylon con el ADN sobre su superficie se bloquea durante 24 horas para minimizar al máximo posibles uniones inespecíficas. Transcurrido este tiempo, la membrana se incubaba nuevamente un mínimo de 24 horas con una sonda marcada radiactivamente y lo suficientemente específica como para reconocer por complementación el fragmento de ADN genómico a partir del que fue diseñada. En último lugar se practican 2-3 lavados a 42 °C con diversas soluciones salinas tras los cuales y después de una exposición de 24-48h, se cuantifica la intensidad de la señal radiactiva mediante un análisis de PhosphorImager. Teniendo en cuenta el patrón de digestión producido por BamHI en el locus de Cdk2 (ver apartado de resultados fig. 13) y la localización de la sonda entre los exones 4 y 5, se generan hasta un total de 3 fragmentos con tamaños de 15 kb, 3,9 kb y 2,6 kb, correspondientes a los alelos silvestre, condicional y deletéreo respectivamente.

5.2.13 Plásmidos y mutagénesis dirigida

Usando como molde un plásmido retroviral generado en el laboratorio que expresaba la proteína quimérica Flag-p27 y siguiendo las indicaciones detalladas en el kit de Stratagene de mutagénesis dirigida, introdujimos las mutaciones deseadas en el dominio de unión a cdk y/o en la región responsable de la interacción con las ciclinas, presentes en la secuencia del inhibidor p27. Para ello se diseñaron los siguientes oligos:

5' GCG CAA GTG GAA TTT CGA CGC ACA GAA TCA TAA GCC CCT GG 3' y su complementario en el caso del mutante sencillo, y 5' CGC CTG CAG AAA TCA CTT CGG CGC GGT CAA TCA TGA AGA ACT 3' y 5'CCAGGGGCTTATGATTCTGTGCGTCGAAATTCCACTTGCGC3' en el caso del triple mutante.

La obtención del resto de plásmidos se realizó por subclonaje en el vector retroviral pBabe de los ADNc de p21, pBabe-p21^{ΔPCNA} y p27 con el enzima de restricción EcoRI.

6 RESULTADOS

6.1 Estudio genético de la función de Cdk2 *in vivo* y su importancia terapéutica como diana antineoplásica.

6.1.1 Generación de animales defectivos en Cdk2

Para determinar el papel *in vivo* desempeñado por esta quinasa dependiente de ciclinas, se decidió realizar un abordaje genético consistente en la modificación del locus endógeno de Cdk2. Con esta finalidad, la Dra. Sagrario Ortega en el laboratorio diseñó un vector de “targeting” con el que introducir el cambio deseado por recombinación homóloga (Fig.13). En primer lugar, se subclonó, a partir de la secuencia genómica completa de Cdk2 (aislada de una librería de ADN comercial), un fragmento genómico que incluía los primeros 5 exones codificantes de Cdk2 más algunas regiones adyacentes. A continuación se introdujo un cassette PGK-neo flanqueado por dos sitios loxP (secuencia diana de la recombinasa Cre) entre los exones 3 y 4, que posteriormente se utilizaría como marcador de selección positiva durante la búsqueda de los clones recombinantes. Se procedió así mismo a la inserción de un segundo cassette, aunque esta vez de selección negativa, PGK-timidinquinasa, en el extremo 3' del vector y de un tercer sitio loxP en el primer intrón, acompañado de dos sitios de restricción nuevos BamHI y NotI, útiles para la digestión diagnóstica posterior (Fig.13). Esta construcción, previamente linealizada, se electroporó en células ES (embryonic stem cells) R1 que se cultivaron en presencia de ganciclovir y G418. Se analizaron por Southern blot 181 clones G418^R/Gan^R de los que sólo 3 resultaron ser positivos para el evento de recombinación homóloga requerido. Estos recombinantes se agregaron a mórulas CD1, que a continuación se implantaron en hembras pseudopreñadas las cuales alumbraron finalmente animales quiméricos. De entre todos ellos se seleccionaron 2 machos (cada uno de ellos procedente de un clon ES diferente) por transmitir el alelo modificado, Cdk2^{loxneo}, a la descendencia resultante del cruce con hembras silvestres. Los animales heterocigotos resultantes, Cdk2^{+loxneo}, se cruzaron con ratones transgénicos portadores de la recombinasa Cre cuya expresión estaba controlada por el promotor ubicuo CMV (CMV-Cre). De este modo, la acción de dicha recombinasa condujo a la generación de un alelo Cdk2⁻ por escisión del ADN genómico comprendido entre los dos sitios loxP más alejados y que contenía como elementos destacables los exones 2 y 3 (Fig. 13). La eliminación de estas secuencias codificantes comporta la pérdida del dominio de unión a ciclinas, PSTAIRE, y la creación, debido al splicing entre los exones 1 y 4, de un cambio en el marco de lectura abierta del gen que conduce a la aparición de un codón de terminación prematuro. El resultado a nivel traduccional sería la generación de un polipéptido truncado de 81 aminoácidos, de los cuales, los 42 últimos determinan una secuencia distinta a la de la proteína original. El quimerismo de estos animales obligó a realizar cruces adicionales con ratones silvestres para finalmente obtener animales heterocigotos, Cdk2^{+/-}, algunos de los cuales carecían ya de la recombinasa Cre. Estos animales, portadores de un alelo Cdk2⁻, son normales y fértiles. Del cruce entre ratones heterocigotos se obtuvieron animales homocigotos Cdk2^{-/-} que nacieron de acuerdo a la

proporción mendeliana esperada (Fig. 14). Por RT-PCR se pudo comprobar la expresión de Cdk2 a nivel transcripcional, encontrándose ARN mensajeros que reflejaban el cambio en el marco de lectura ocasionado a nivel genómico. Por western blot, en cambio, no se pudo detectar, al menos con varios anticuerpos diferentes, ninguna traza de proteína, ni si quiera del teórico polipéptido truncado que habría podido llegarse a sintetizar.

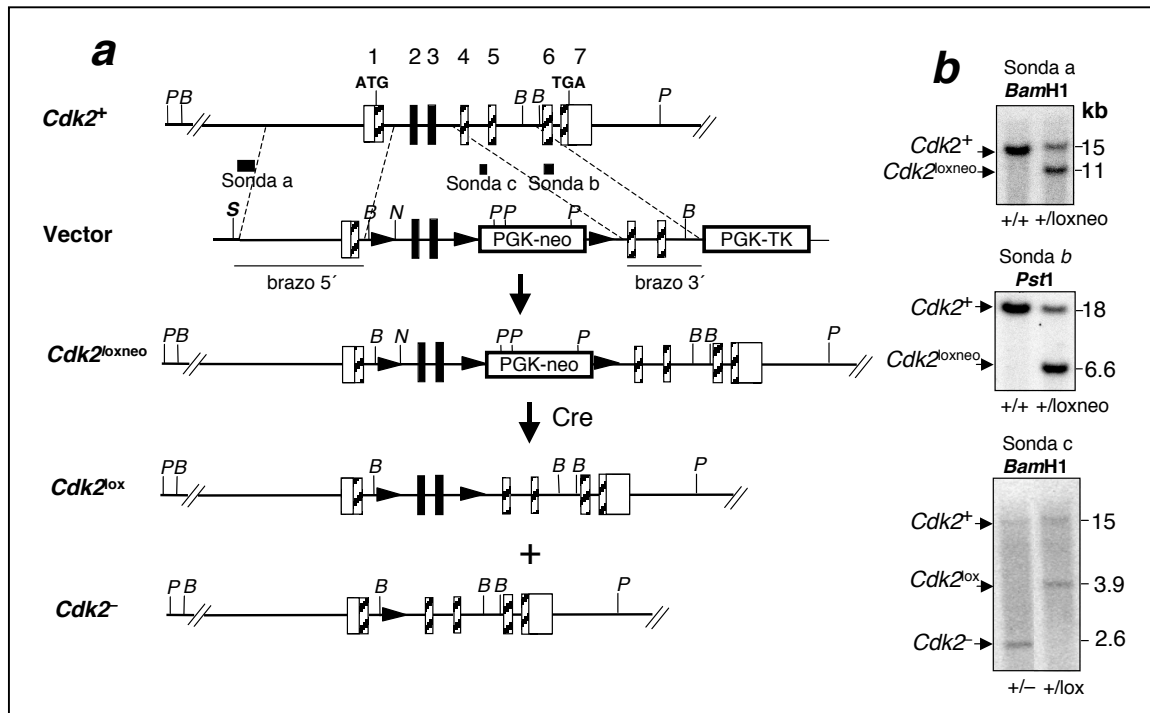


Figura 13. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la modificación del locus endógeno de Cdk2. a) La introducción en éste por recombinação homóloga de la alteración genómica deseada conduce, tras la expresión de la recombinasa Cre, a la aparición de dos variantes alélicas: una deletérea de forma inducible, $Cdk2^{lox}$, susceptible de ser inactivada de forma controlada tanto en el espacio como en el tiempo, y otra, $Cdk2^{-}$, en la que la eliminación de las secuencias comprendidas entre los sitios lox (flechas flanqueantes de los exones 2 y 3 y del marcador de selección PGK-neo) anula de forma irreversible su capacidad codificante. b) Mediante el uso de las sondas apropiadas y por digestión diagnóstica es posible identificar aquellos clones positivos para la modificación primitiva (sondas a y b), así como discriminar entre los distintos eventos de recombinação homóloga ocurridos tras la introducción de la recombinasa Cre (sonda c).

La estrategia que se ha descrito contempla la posibilidad de obtener un modelo de ratón condicional en previsión de la posible letalidad embrionaria a la que podría haber conducido la ausencia de Cdk2 desde fases tempranas del desarrollo embrionario. Se decidió por lo tanto, a la vez que se generaba el modelo **Knock-out** clásico, trabajar paralelamente en la generación del modelo condicional. Como los cruces de animales $Cdk2^{+/loxneo}$ con los tragénicos de CMV-Cre conducían a una escisión total, insuficiente para la obtención del alelo $Cdk2^{lox}$ que requería la eliminación del casete PGK-neo y la preservación de los exones 2 y 3 flanqueados por sendos sitios loxP, se optó por un abordaje *in vitro* del problema. El material de partida lo constiuyeron las células ES heterocigotas $Cdk2^{+/loxneo}$ descritas con anterioridad, que fueron electroporadas con un plásmido de expresión que contenía la recombinasa bacteriana Cre. Se analizaron por Southern blot distintos clones, algunos de los cuales

exhibían claros signos de mosaicismo al presentar los distintos eventos de recombinación homóloga posibles (Fig.13). Tras un nuevo paso de subclonaje se aislaron clones puros del genotipo deseable, $Cdk2^{+/lox}$, que se agregaron a mórulas CD1 finalmente implantadas en hembras receptoras apropiadas. Las quimeras resultantes se cruzaron con animales silvestres observándose en algunos casos transmisión a la línea germinal. Las camadas procedentes de los cruces de animales transmisores del alelo modificado, se genotiparon por Southern blot y los animales $Cdk2^{+/lox}$ que aparecieron, volvieron a cruzarse nuevamente entre ellos. De estos cruces se obtuvieron descendientes $Cdk2^{lox/lox}$, en una proporción similar a la frecuencia mendeliana esperable. Hemos podido comprobar que estos animales son perfectamente normales y no revisten ninguna diferencia anatómica o de comportamiento con respecto a los animales silvestres. Aprovechando la existencia en el laboratorio de la cepa de ratones CreERT, generada por la doctora Victoria Campuzano, se obtuvieron, tras varias rondas de cruces, animales $Cdk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}$. Los animales CreERT ofrecen la posibilidad de crear un sistema inducible de escisión mediante una activación controlada espacio-temporal de la recombinasa Cre. Para el establecimiento de esta línea el ADN complementario de la proteína quimérica resultante de la fusión de la recombinasa Cre y una versión mutada del receptor de estrógenos (que es insensible a los estrógenos producidos por el propio organismo), se introdujo ,por recombinación homóloga ,en el extremo 3' del gen de expresión ubiqua de la ARN polimerasa II y precediendo a la secuencia de poliA que señala la terminación transcripcional. La inserción de un sitio IRES entre ambas secuencias codificantes permite la síntesis de un ARN bicistrónico que al traducirse da lugar a sendos productos proteicos sin afectar a la funcionalidad de la polimerasa. Aunque la expresión de la recombinasa Cre queda bajo el control del promotor endógeno de la ARN polimerasa II, su translocación al núcleo y por tanto su posibilidad de alcanzar las secuencias loxP diana, pasa a depender de la presencia de hidroxitamoxifeno (o derivados de éste), un análogo estructural del estrógeno, frente al cual, la versión modificada del receptor de estrógenos es receptivo. Por tanto, mediante la inoculación a ratones condicionales para nuestro gen de interés de este producto sintético o bien a través de su presencia en el medio de cultivo en el que se encuentran creciendo células portadoras de la mutación condicional, podemos provocar una delección controlada. El uso de estos animales y células $Cdk2$ condicionales de inactivación inducible se discutirá más adelante.

6.1.2 Características fenotípicas de los animales $Cdk2^{-/-}$

Sorprendentemente y en contra de todo lo postulado hasta la fecha sobre la importancia de $Cdk2$ en la progresión del ciclo celular, pudimos constatar la aparición de animales homocigotos $Cdk2^{-/-}$ en las camadas generadas a partir de cruces entre parentales heterocigotos, en una proporción similar a la mendeliana esperada (Fig.14). No había por tanto signos de letalidad embrionaria. Aunque en un principio estos animales defectivos en $Cdk2$ parecían más pequeños que sus hermanos de camada, con el paso de las generaciones la disminución en el tamaño corporal se atenuó hasta que fue imposible correlacionar este

fenotipo inicial con la falta de Cdk2. Tampoco observamos diferencias significativas en la supervivencia y etología de estos animales comparados con el grupo control (Fig.14). Tras un exhaustivo análisis histológico de muestras de diverso origen tisular, no encontramos anomalías anatomohistológicas destacables con la única excepción de las gónadas. Tanto machos como hembras eran estériles, si bien su comportamiento sexual era del todo normal.

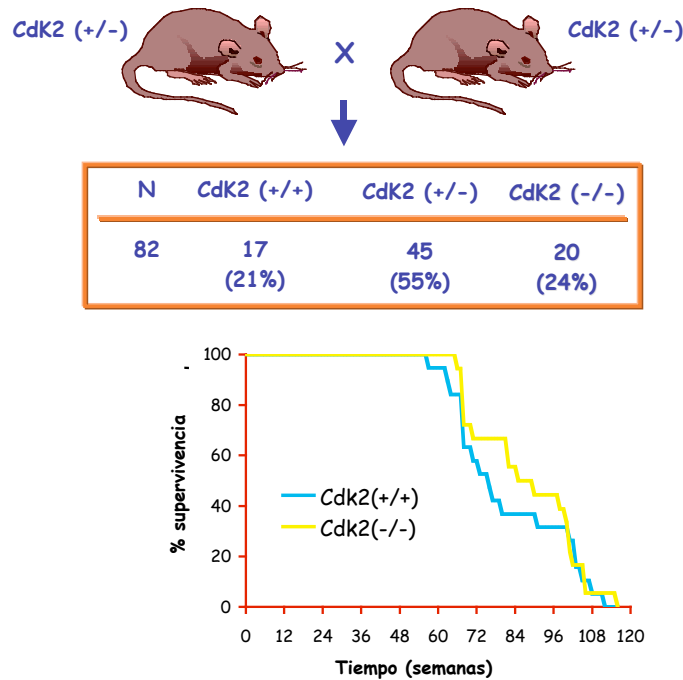


Figura 14. Frecuencias fenotípicas observadas tras el cruce de animales heterocigotos y curva de supervivencia comparativa de los grupos control y mutante.

Decidimos realizar un estudio más detallado a fin de caracterizar mejor la fertilidad comprometida que exhibían estos animales $Cdk2^{-/-}$. En el caso de los machos era evidente la atrofia testicular, que llegaba a ser de hasta un 80% en comparación con el tamaño de un testículo silvestre. Analizamos muestras histológicas obtenidas a partir de testículos postembrionarios en distintos estadios de maduración. Fijamos nuestra atención en 3 momentos: P15, P20 y P30. En P15, cuando las únicas células germinales son espermatogonias y espermatocitos 4n premeióticos, no se apreciaban diferencias (Fig.15). Avanzando 5 días más, a P20, la situación era completamente distinta. En este punto, una parte significativa de esos espermatocitos primarios 4n (diploides pero con el contenido genético duplicado) han completado la primera fase de división meiótica dando lugar a espermatocitos secundarios 2n (haploides pero con un contenido genético doble). Además, algunos de estos espermatocitos 2n han podido progresar a lo largo de la meiosis II y haber generado espermatidas redondas, estadio algo anterior al de espermatozoide. A P20, los túbulos seminíferos de animales $Cdk2^{-/-}$ aparecían completamente desprovistos de células post-meióticas (espermátidas redondas mayoritariamente) y además era notable la respuesta

apoptótica de los espermatocitos primarios (Fig.15). Evaluamos también la capacidad proliferativa de las espermatogonias progenitoras por inmunodetección del marcador de proliferación ki67, y comprobamos que no se encontraba afectada (Fig.15). A P30 y en ausencia de Cdk2, las espermatogonias continuaban proliferando mientras que la ausencia de células reproductoras, tanto en el lumen de los túbulos seminíferos como en el epidídimo, persistía. También se mantenía la apoptosis y la consecuente reducción en el número de espermatocitos primarios (Fig. 15).

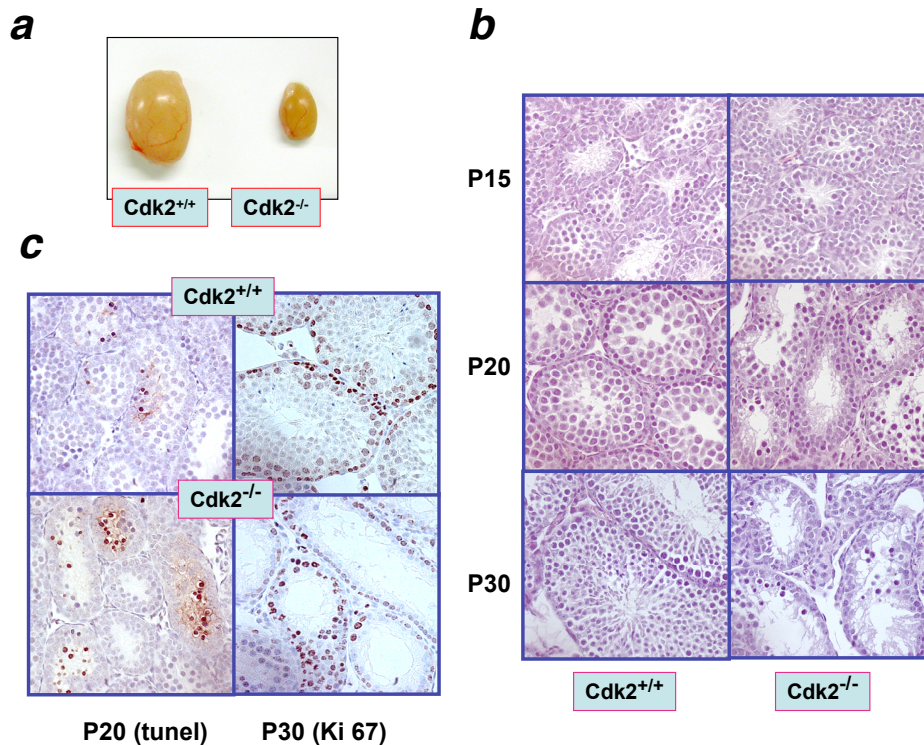


Figura 15. a) Aspecto macroscópico de testículos Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-}. b) Tinción con H&E de secciones testiculares control y mutantes correspondientes a distintos estadios de la primera oleada de espermatogénesis (P15 y P20) y de muestras próximas a la madurez sexual (P30). c) Examen de la actividad proliferativa (ki67) y apoptótica (tunel) de túbulos seminíferos Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-} en distintos momentos del desarrollo postnatal.

Al igual que en el caso de los machos, en las hembras se decidió hacer un seguimiento pormenorizado del proceso de gametogénesis. A diferencia de la espermatogénesis, en la que existen diversas oleadas de proliferación/diferenciación, en la ovogénesis existe una única ronda que se inicia durante el desarrollo embrionario y se interrumpe justo antes del nacimiento (E18.5) cuando los ovocitos primarios alcanzan el estadio de diploteno durante la profase I de la meiosis (folículos primordiales). En la pubertad, estímulos hormonales permiten a un cierto número de ovocitos (folículos primarios) crecer y completar el primer ciclo de división meiótico, progresando hasta la metafase II en la que nuevamente se detienen. Finalmente, la fertilización termina por completar esta segunda ronda de división celular. Así, a día E17.5 del desarrollo embrionario cuando la mayor parte de los ovocitos se encuentran en el estadio de paquiteno de

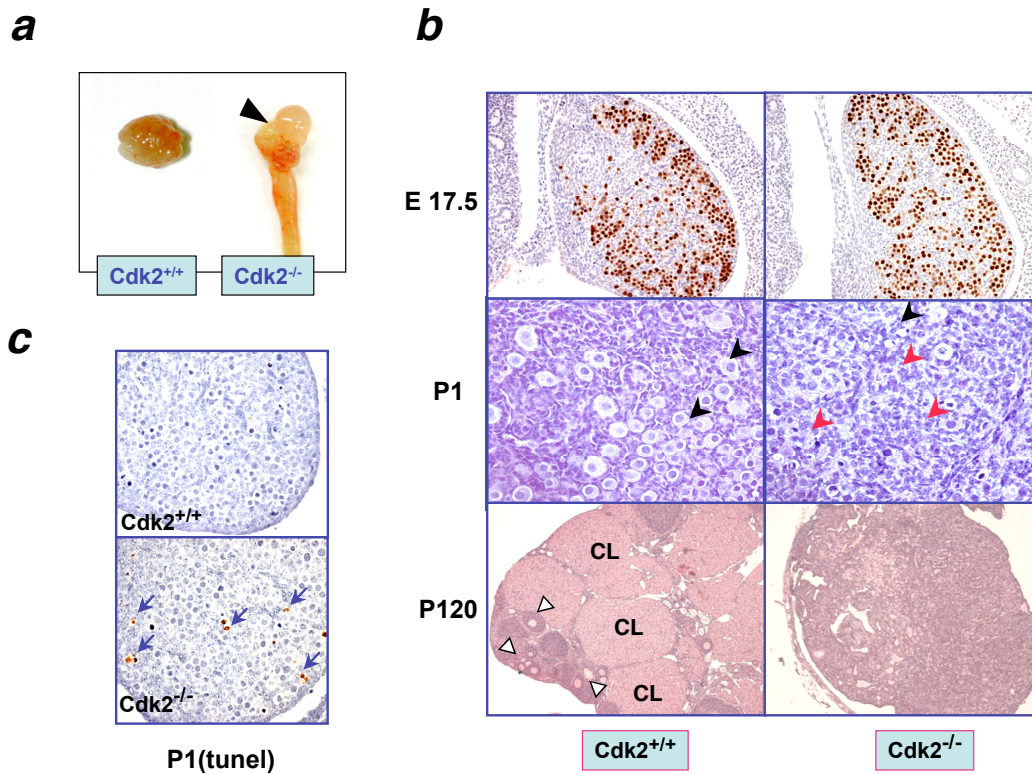


Figura 16. **a)** Morfología de dos ovarios $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$ con una formación quística sobre éste último (flecha). **b)** Inmunodetección de células proliferativas en ovarios embrionarios (E17.5) y tinción con H&E de secciones correspondientes a muestras perinatales (P1) y sexualmente maduras (P120) donde se aprecian folículos primarios (flechas negras), formaciones foliculares atróficas (flechas rojas), folículos maduros (flechas blancas) y el cuerpo lúteo (CL). **c)** Respuesta apoptótica en ovarios perinatales de hembras control y mutantes. Las flechas señalan células inmunoreactivas.

la meiosis I, no se observan diferencias en la arquitectura ovárica con respecto al grupo control, siendo muy similar el número de ovocitos (Fig.16). Sin embargo, a día P1, en el que un gran número de ovocitos ha alcanzado la fase de diploteno, los ovarios de hembras $Cdk2^{-/-}$ contenían muchos menos ovocitos y presentaban un mayor número de células apoptóticas (Fig.16). A día P14 la ausencia de ovocitos era mucho más marcada. Esta observación indica que dichas células morían mayoritariamente durante el estadio perinatal. Finalmente, en hembras $Cdk2^{-/-}$ sexualmente maduras, de 3-4 meses de edad, los ovarios eran claramente atróficos, carecían de folículos y cuerpo lúteo, y en muchos casos se pudo observar la aparición de formaciones quísticas que remplazaban el tejido ovárico normal (Fig. 16).

6.1.3 Estudio de las propiedades proliferativas de MEFs Cdk2^{-/-}

Como una aproximación *in vitro* para evaluar las posibles consecuencias que la falta de Cdk2 pudiera tener en la proliferación celular, se pusieron en cultivo fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-}, obtenidos a partir de embriones de 13.5 d.p.c. y a continuación se realizaron distintos ensayos proliferativos.

La capacidad de células individuales para generar colonias de dimensiones apropiadas, es un fiel reflejo de la capacidad que esa célula tiene para dividirse de forma continuada. Por tanto, es posible estimar el efecto que una determinada mutación puede tener en el potencial proliferativo mediante el análisis comparativo de las eficiencias de formación de colonias. Para ello sembramos a baja densidad células Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-}, esperamos entre 2-3 semanas a la aparición de colonias, tras lo cual, y mediante tinción con azul de metileno, procedimos a su cuantificación considerando como diámetro mínimo cuantificable 3 mm. Observamos una reducción del 25-30% en el número de colonias Cdk2^{-/-} con respecto al control Cdk2^{+/+}, lo que parece atribuir una cierta ventaja proliferativa a los MEFs silvestres con el número de pases debido posiblemente a una entrada algo prematura en senescencia (Fig. 17).

Quisimos igualmente determinar la funcionalidad de la inhibición por contacto en las células mutantes, para lo cual esperamos durante 12 días a que el cultivo alcanzara la saturación. En ambos tipos celulares a un periodo de crecimiento exponencial sucedía una fase estacionaria indicativa del cese proliferativo. Además no encontramos diferencias relevantes en el número de células una vez alcanzada la confluencia (Fig. 17).

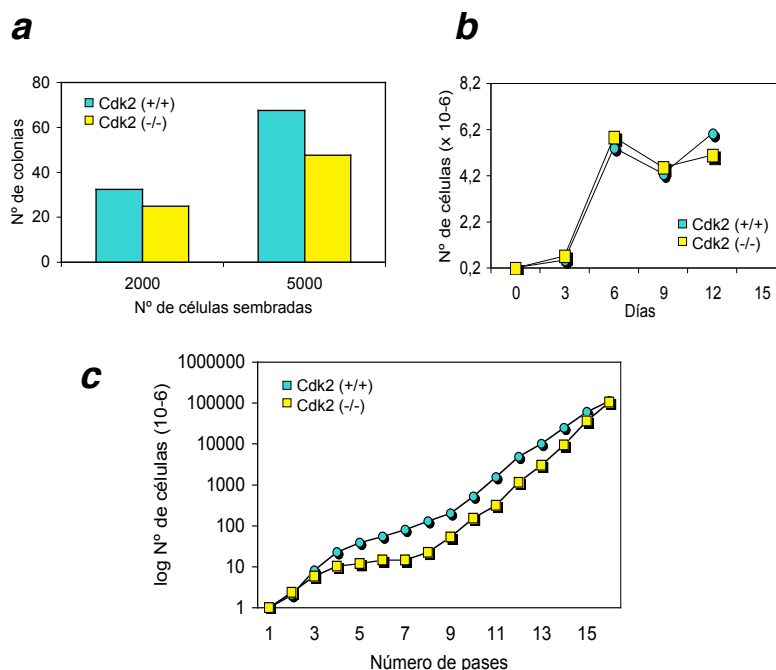


Figura 17. Propiedades proliferativas de MEFs Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-}. a) Eficiencia de plaqueo. b) Densidad de saturación. c) Curva de immortalización.

Decidimos seguidamente evaluar la capacidad de immortalización que permite a las células primarias superar el periodo de crisis que se produce tras 10-15 días en cultivo y recuperar el ritmo de crecimiento exponencial de las etapas iniciales. Son normalmente mutaciones en la ruta de Rb y p53 las responsables de este proceso. Para favorecer la aparición de eventos immortalizantes, cultivamos MEFs primarios de ambos genotipos de acuerdo con el protocolo de pase seriado 3T3, que establece la realización de un conteo y plaqueo celular cada 3-4 días. A diferencia de los MEFs Cdk2^{+/+}, las células Cdk2^{-/-} entraban uno o dos pases antes en crisis y su salida de la etapa de senescencia se veía a veces retrasada cuando se comparaba con la de las células silvestres (Fig. 17). Además, la eficiencia de immortalización en ausencia de Cdk2 resultó ser algo menor de modo que mientras que la totalidad de clones Cdk2^{+/+} sujetos al protocolo 3T3 consiguieron immortalizarse hubo un 33% de clones Cdk2^{-/-} que no lograron superar la etapa de crisis y no pudieron llegar a immortalizarse. Analizamos el status de p53, p21 y p16 en 10 embriones inmortales Cdk2^{-/-} y 6 embriones Cdk2^{+/+} (una representación de los mismos aparece en la figura 18). Para ello pusimos todas estas líneas celulares en presencia de adriamicina. Este agente genotóxico, debido al daño que causa en el ADN, activa el gen supresor p53 que a su vez induce la expresión de p21, uno de los efectores más importantes de esta vía de señalización celular. En presencia de adriamicina los niveles de p53 aumentaban en todos los embriones analizados salvo en el caso de un clon Cdk2^{+/+} y otro Cdk2^{-/-} donde la expresión de p53 era constitutiva (Fig. 18). Tan sólo en 3 de los clones Cdk2^{-/-} y 2 de los clones control pudimos detectar ausencia de p53 funcional al no haberse encontrado inducción de p21. La expresión de p16 resultó fallida únicamente en 3 clones Cdk2^{-/-} y un clon silvestre, sin que la alteración de esta ruta coexistiera nunca con la de p53. Por consiguiente, en la mitad de los clones tanto mutantes como silvestres se desconocen las mutaciones responsables de la immortalización.

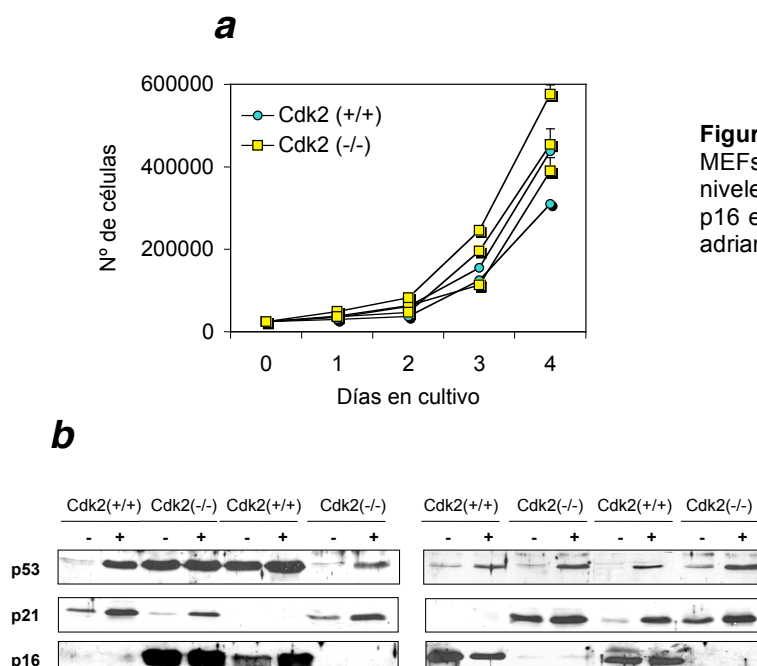


Figura 18. a) Curva de crecimiento de MEFs inmortales. **b)** Análisis de los niveles de expresión de p53, p21 y p16 en MEFs tratados (+) o no (-) con adriamicina.

Una posible explicación a la ausencia de defectos proliferativos en un escenario sin Cdk2, la podíamos encontrar en la capacidad de adaptación o plasticidad que pueden poseer las células embrionarias y que les permitiría poner en marcha mecanismos compensatorios con los que superar ese déficit génico impuesto desde el mismo comienzo del desarrollo embrionario. Si esto fuera así, una pérdida súbita de Cdk2 podría requerir de un cierto tiempo de adaptación durante el cual la proliferación celular pudiera verse algo más comprometida.

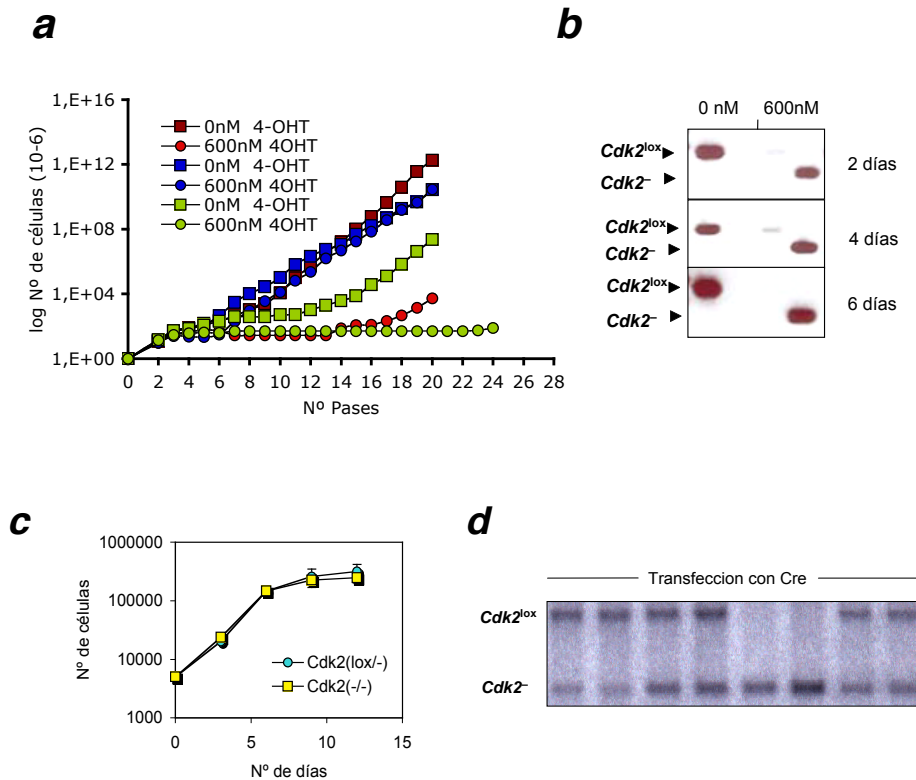


Figura 19. a) Curva de immortalización de MEFs condicionales para Cdk2 en presencia (600nM) y ausencia (0nM) de 4-OHT. **b)** Análisis por PCR de la eficiencia de escisión de Cdk2. **c)** Efecto proliferativo de la pérdida de Cdk2 a largo plazo. **d)** Análisis por Southern blot de la eficiencia de escisión de Cdk2.

Para evaluar esta posibilidad obtuvimos MEFs condicionales de Cdk2 y de escisión inducible, Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}, que pusimos en cultivo tanto en ausencia como en presencia de 4-hidroxitamoxifen (4-OHT). Por PCR pudimos comprobar que a los 6 días de tratamiento con 4-OHT la inactivación del gen era completa (Fig 19). Tras repetidos pases en cultivo observamos que los MEFs que habían perdido Cdk2 de forma repentina, si bien entraban en crisis algo antes que los controles, llegaban a immortalizarse casi por completo (3/4). Su comportamiento era, por tanto, idéntico al de MEFs que en origen eran Cdk2^{-/-}. Otra aproximación distinta que nos condujo al mismo resultado, la obtuvimos transfectando células inmortales Cdk2^{lox/lox} con un plásmido de expresión de la recombinasa Cre. Después de tres semanas en selección con neomicina, picamos y expandimos 8 clones individuales, de los que

dos resultaron ser defectivos para Cdk2 (Fig.19). En los 6 restantes, posiblemente, una integración defectuosa del plásmido silenció la expresión de la recombinasa que no pudo desempeñar su función. A continuación, para analizar las posibles consecuencias proliferativas a largo plazo de una pérdida brusca de Cdk2, realizamos una curva de crecimiento que finalmente no arrojó diferencias (Fig. 19)

6.1.4 Análisis bioquímico

A continuación nos propusimos examinar, a fin de caracterizar de una forma molecular la proliferación de células deficientes en Cdk2, las repercusiones que la pérdida de esta quinasa pudiera tener en el patrón de expresión de distintos reguladores de ciclo, así como sobre la actividad quinasa de sus ciclinas mayoritarias. Usamos extractos proteicos obtenidos a partir de cultivos asincrónicos de MEFs Cdk2^{-/-} y Cdk2^{+/+} cultivados a pases 2, 4 y 6 y realizamos ensayos de western blot usando anticuerpos específicos contra distintas Cdk, ciclinas y CKIs (inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas).

A pase 2, MEFs Cdk2^{-/-} y Cdk2^{+/+} crecían de forma exponencial y con cinéticas similares. Tan sólo se observó una pequeña disminución en los niveles de Cdk1, ciclina E y ciclina A cuando Cdk2 no se encontraba presente (Fig.20).

A pase 4, la falta de Cdk2 causaba una ralentización clara del ritmo proliferativo, indicando este hecho una entrada más temprana en crisis que en el caso de los MEFs silvestres. El decremento que se insinuaba dos pases antes en los niveles de Cdk1, ciclina E y ciclina A cuando Cdk2 estaba ausente, era ahora más pronunciado (Fig.20). De hecho, la expresión de ciclina A era casi indetectable. También en las células Cdk2^{+/+} se observó una caída en los niveles de Cdk1 y ciclina A con respecto al pase anterior, si bien superaban significativamente los detectados en las células mutantes (Fig.20).

Finalmente, a pase 6, cuando tanto los MEFs control como los mutantes apenas proliferaban, la situación anteriormente descrita se acentuó todavía más. En ausencia de Cdk2 se pudo observar una disminución mayor de Cdk1 y ciclina E, no sólo en comparación con los niveles que estas proteínas alcanzaban en los MEFs silvestres, sino también con respecto al pase anterior (Fig.20). La ausencia de ciclina A, hasta este momento circunscrita tan sólo a los extractos mutantes, se hizo extensible también a los silvestres (Fig.20). En estos últimos y respecto al pase anterior, se vio una reducción en los niveles de Cdk1, Cdk2 y ciclina E (Fig.20).

Cuando analizamos el status de estos reguladores de ciclo en células inmortales, comprobamos cómo en MEFs Cdk2^{-/-}, tan sólo los niveles de expresión de las ciclinas E y A se mantenían ligeramente más bajos que en las células control (Fig.21).

Con respecto al patrón de expresión de otras proteínas de ciclo como Cdk4, ciclina D1, p21 y p27, señalar que no se encontraron diferencias ni entre genotipos ni con los pases (Fig.20).

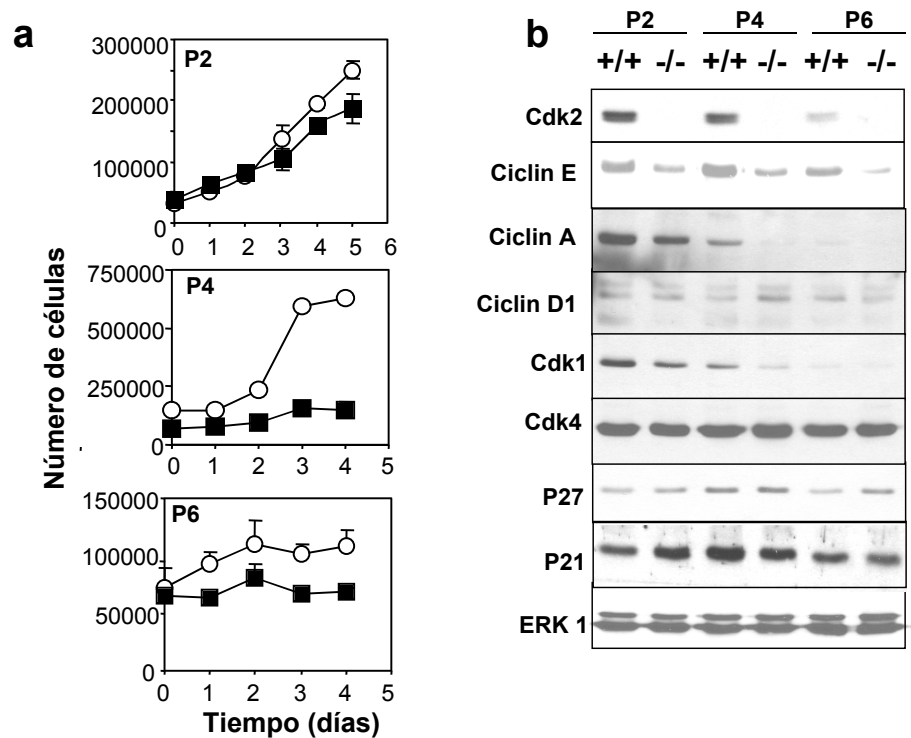


Figura 20. a) Curvas de crecimiento de MEFs $Cdk2^{+/+}$ (círculos blancos) y $Cdk2^{-/-}$ (cuadrados negros) a distintos pases tempranos. **b)** Niveles de expresión de diversas proteínas reguladoras de ciclo en células control y deficientes en $Cdk2$.

Teniendo en cuenta que la actividad de $Cdk2$ depende principalmente de su asociación con las ciclinas E y A, optamos por evaluar la actividad quinasa de dichas ciclinas en un contexto sin $Cdk2$. Realizamos ensayos *in vitro* en los que inmunoprecipitamos cada una de estas dos ciclinas y analizamos su habilidad a la hora de fosforilar, tanto en ausencia como en presencia de $Cdk2$, dos sustratos adecuados, retinoblastoma (Rb) e histona H1. Como era de

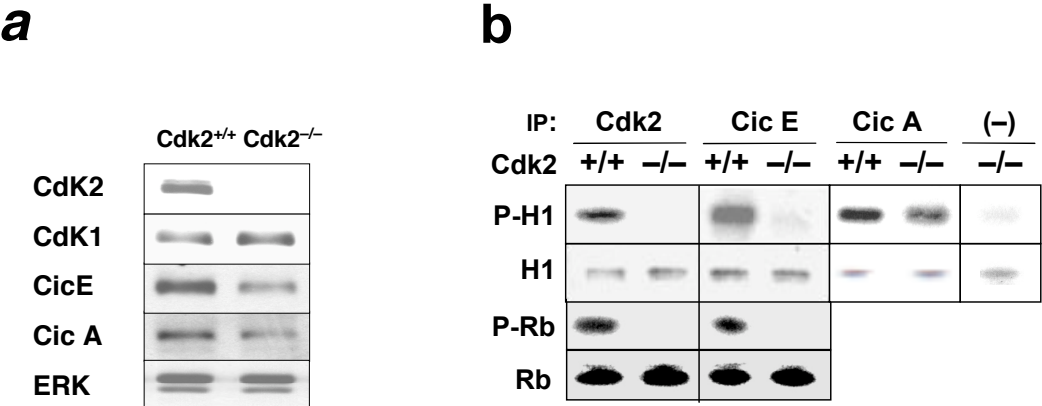


Figura 21. a) Análisis de los niveles de expresión de las Cdk y ciclinas indicadas en MEFs inmortalizados de ambos genotipos. **b)** Ensayos de actividad quinasa asociada a $Cdk2$ y a sus dos ciclinas mayoritarias, ciclinas E y A, a partir de extractos proteicos de MEFs primarios control y mutante en presencia de histona H1 o Rb.

esperar, la inmunoprecipitación de complejos Cdk-ciclina con anticuerpos contra Cdk2 incubados con muestras proteicas procedentes de MEFs mutantes, no arrojó ningún signo de fosforilación sobre ninguno de los dos sustratos analizados (Fig.21). Los inmunoprecipitados de ciclina E obtenidos a partir de extractos Cdk2^{-/-} fueron incapaces de adicionar grupos fosfato tanto a Rb como a la histona H1, indicando que, con al menos estos sustratos y teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica, Cdk2 parece ser la única quinasa activada por su unión a ciclina E (Fig.21). A diferencia de ésta, cuando se inmunoprecipitó ciclina A y se examinó la fosforilación de la histona H1, comprobamos que, aunque en niveles inferiores a los encontrados en el caso de extractos control, la falta de Cdk2 no anulaba por completo la actividad quinasa asociada a esta ciclina, posiblemente por su capacidad de interacción con Cdk1 (Fig.21). Por tanto, la falta de Cdk2 y la ligera reducción en los niveles de expresión de la propia ciclina A y de su segunda quinasa activadora Cdk1, explicarían la disminución observada en la fosforilación de la histona H-1 por inmunoprecipitados de ciclina A en extractos proteicos sin Cdk2.

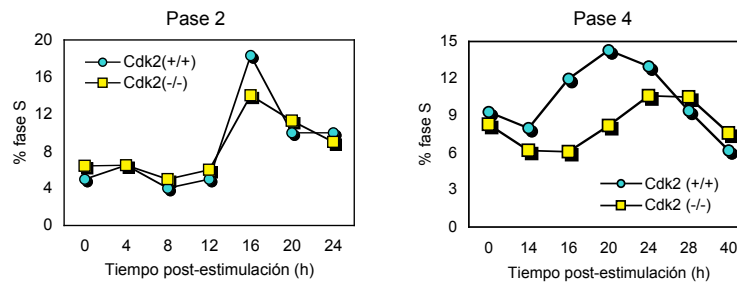
6.1.5 Cinética de entrada en fase S en MEFs y hepatocitos Cdk2^{-/-}

Teniendo en cuenta que el estudio con MEFs asincrónicos no reveló ninguna diferencia significativa en el comportamiento proliferativo de las células mutantes, decidimos analizar si esta tendencia de normalidad era extrapolable a MEFs que crecían de forma sincrónica. O, en otras palabras, ¿podría la ausencia de Cdk2 estar causando algún problema en la salida de quiescencia no evaluable en condiciones de crecimiento continuado? Un ejemplo que nos hace plantearnos esta pregunta lo encontramos en los MEFs dobles mutantes para las ciclinas E1 y E2 (Geng et al., 2003). Estas células, aunque proliferan con normalidad mientras se encuentran en división continua, son incapaces de, tras ser forzadas a salir del ciclo celular, abandonar la fase de quiescencia en respuesta a estímulos mitogénicos. Por este motivo y por la consabida dependencia funcional existente entre ambas ciclinas E por Cdk2, decidimos analizar este proceso.

Para ello, limitamos los niveles de suero (de un 10% a un 0,1%) del medio de cultivo en el que se encontraban proliferando de forma exponencial MEFs de ambos genotipos. La disminución de señales mitogénicas obliga a las células a abandonar el ciclo de división celular, entrando en una fase de reposo o quiescencia. Los mantuvimos en estas condiciones restrictivas de suero durante 60-72 h, al cabo de las cuales volvimos a restablecer la situación proliferativa inicial añadiendo medio con 10% de suero fetal. A partir de este cultivo sincrónico fuimos recogiendo muestras a distintos tiempos post-estimulación que fueron analizadas, dependiendo del caso, por western blot y por citometría de flujo. A pases tempranos (P2), tanto los MEFs mutantes como los silvestres entran al mismo tiempo en fase S (16h), si bien en los primeros el pico es algo inferior al de los MEFs control (14% frente a 18%) (Fig.22). Sin embargo, a pases más tardíos (P4), cuando la ausencia de Cdk2 ha mermado la capacidad proliferativa, la cinética de entrada de los MEFs deficientes en Cdk2 se retrasa unas 4 horas

con respecto al control (Fig.22). Este retraso se correlaciona con el observado en el patrón de fosforilación de la proteína del retinoblastoma en los MEFs $Cdk2^{-/-}$ (Fig.22).

a



b

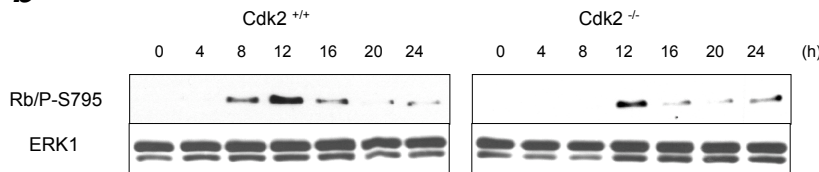
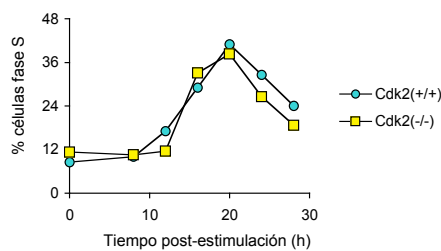


Figura 22. a) Cinética de entrada en fase S de MEFs primarios $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$. **b)** Patrón de fosforilación de Rb a distintos tiempos post-estimulación en MEFs de ambos genotipos a pase 4.

En células inmortales, donde se recupera de nuevo el crecimiento exponencial de los pases primarios (Fig.18), la entrada en fase S es muy similar en las células control y mutantes. Además tampoco se observaron diferencias en el patrón de expresión de distintos reguladores de ciclo. Así, la inducción de Cdk1 y de las ciclinas E y A, dependiente en su mayor parte de la actividad de los factores de transcripción E2F, se producía con normalidad en ambos contextos genéticos (Fig.23).

a



b

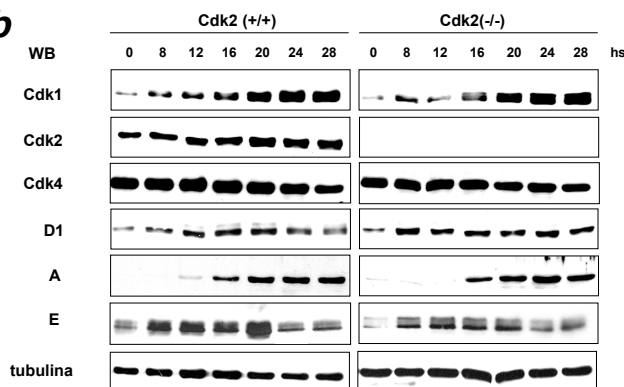


Figura 23. a) Cinética de entrada en fase S de MEFs inmortales $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$. **b)** Perfil de expresión de distintos reguladores de ciclo en poblaciones sincrónicas de MEFs inmortales $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$.

Quisimos completar este estudio con una aproximación *in vivo*, para lo cual buscamos un modelo que nos permitiera trabajar con una población celular mayoritariamente quiescente pero susceptible de ser estimulada a dividirse. El hígado es un tejido que se adecuaba bastante bien a nuestras pretensiones ya que se sabe desde hace bastante tiempo que determinados estímulos citotóxicos y quirúrgicos inducen la proliferación de los hepatocitos quiescentes en condiciones normales. La hepatectomía parcial es una práctica quirúrgica bastante bien caracterizada que consiste en la resección de las 2/3 partes de la masa hepática de modo que los tres lóbulos remanentes de menor tamaño son los responsables de devolver al órgano sus dimensiones originales. Durante este proceso de restauración celular, hay una intensa respuesta proliferativa por parte de los hepatocitos, que se dividen, al menos durante los primeros días, de una forma sincrónica. Operamos 20 animales de ambos genotipos y monitorizamos el proceso recogiendo muestras a distintos tiempos post-hepatectomía, previa inyección de BrdU (bromodesoxiuridina), a fin de detectar la población celular en división. Aunque esta práctica es bastante compleja debido a las múltiples variables que pueden afectar al proceso de regeneración hepática (sexo, edad, alimentación, fondo genético...), pudimos comprobar cómo la ausencia de Cdk2 daba lugar a un cierto retraso en la cinética de entrada en fase S (Fig.24). Sin embargo, tanto en el caso de los ratones mutantes como en el de los controles, transcurridos 9 días desde la realización de la intervención, la regeneración hepática era prácticamente completa (Fig.24).

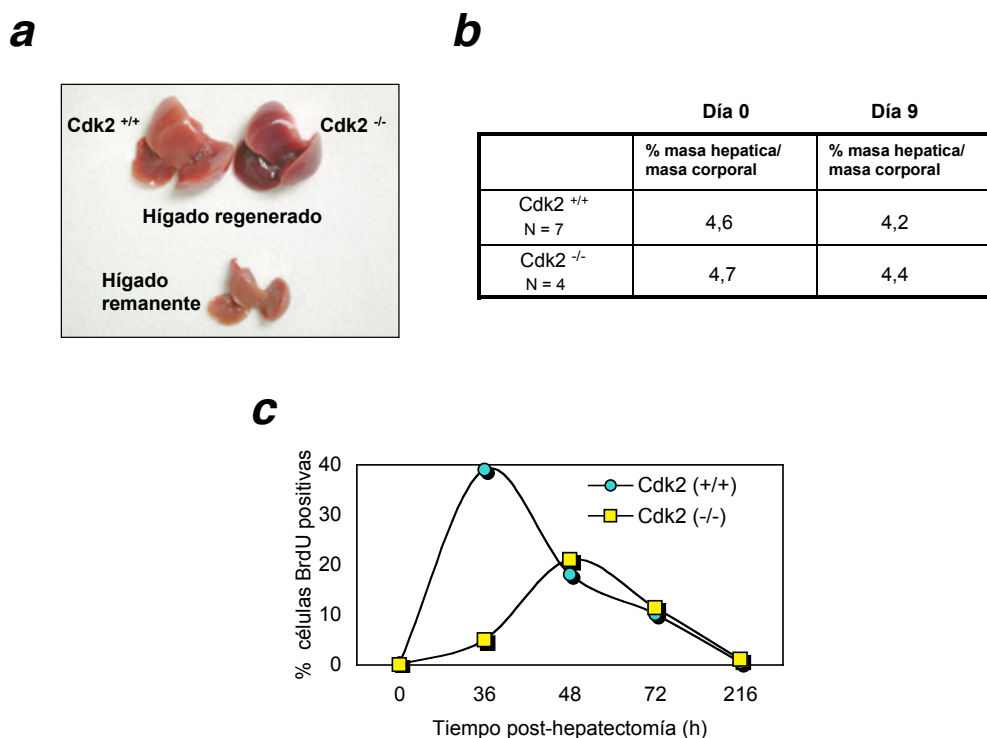


Figura 24. **a)** Resultado de la regeneración hepática transcurridos 9 días desde la realización de la hepatectomía parcial. **b)** Recuperación del cociente %masa hepática/masa corporal en ratones de ambos genotipos 9 días después de extirparse el 70% de la masa hepática. **c)** Monitorización del proceso de regeneración hepática mediante la cuantificación de células positivas para BrdU a distintos tiempos post-hepatectomía.

6.1.6 Duplicación de centrosomas en MEFs Cdk2^{-/-}

Numerosos estudios habían atribuido a los complejos Cdk2-ciclina A/E un papel determinante en el ciclo de división centrosómica (Lacey et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Meraldi et al., 1999). Así por ejemplo, se ha visto que la inhibición de Cdk2 por sobreexpresión de p21 o de un dominante negativo bloqueaba la división de los centrosomas en células CHO tratadas con el agente bloqueante hidroxurea (HU). Además, la inactivación del factor de transcripción E2F mediante la sobreexpresión de una forma mutada de Rb insensible a la fosforilación de las Cdk, bloquea de igual modo la replicación de estos orgánulos. En este contexto, la adición de ciclina A, y en menor medida de la ciclina E, es capaz de revertir el bloqueo (Meraldi et al., 1999).

La implicación de Cdk2 en este proceso pasaría por la capacidad de esta serín/treonin kinasa de regular, vía fosforilación, la localización y estabilidad de ciertos componentes de la maquinaria centrosomal. Como ya hemos señalado en la introducción, se ha descrito recientemente que la fosforilación de la proteína Nucleofosmina por el complejo Cdk2/ciclina E, es esencial en el control de la duplicación de los centrosomas a través de la relocalización de esta proteína. En los últimos años se ha demostrado también la participación de Cdk2 en la estabilización de otra proteína centrosomal, Mps1p, cuya actividad quinasa es igualmente necesaria para que la replicación de los centrosomas sea correcta. Por consiguiente, parece que la ruta de Rb así como la actividad quinasa asociada a Cdk2, son claves en la regulación tanto del proceso de replicación del ADN como de la duplicación centrosómica.

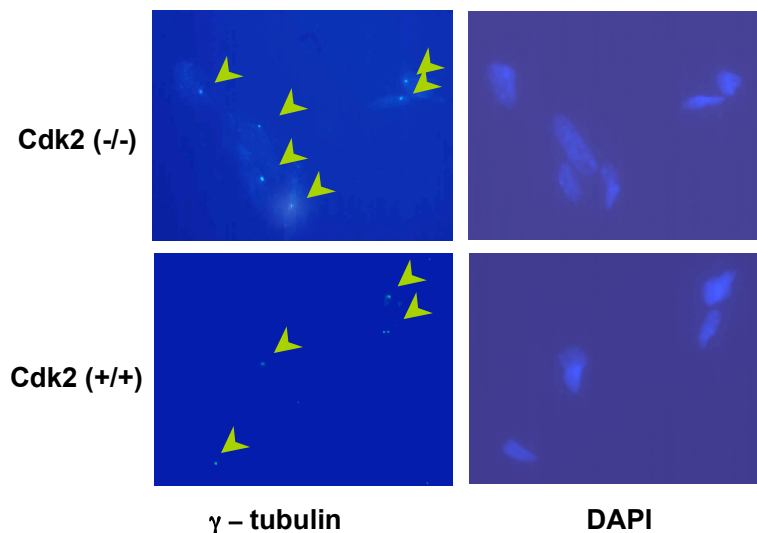


Figura 25. Detección por inmunofluorescencia de centrosomas (flechas amarillas) en MEFs primarios Cdk2 (+/+) y Cdk2 (-/-) mediante el uso de anticuerpos anti γ - tubulina. La visualización de los núcleos celulares se consiguió por tinción con el agente intercalante DAPI.

Los centrosomas están formados por un par de agrupaciones cilíndricas de 9 tripletes de microtúbulos dispuestas perpendicularmente entre sí, denominadas centriolos. Estas estructuras están inmersas en una matriz pericentriolar constituida por γ -tubulina y pericentrina entre otros componentes, que es la responsable de la nucleación y organización

de los microtúbulos. Valiéndonos de esta información nos dispusimos a analizar el estado de los centrosomas en células carentes de Cdk2. Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la tubulina de la matriz pericentriolar y el posterior empleo de anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos, conseguimos detectar la presencia de centrosomas tanto en células Cdk2^{+/+} como Cdk2^{-/-}, sin que pudiéramos constatar ningún tipo de alteración (fig.25). Únicamente la población de células Cdk2^{-/-} con dos centrosomas estaba algo más disminuida que la de las células control (15% células Cdk2^{-/-} vs. 30% células Cdk2^{+/+}), posiblemente por un ritmo proliferativo algo menor de las células mutantes. Por tanto y de acuerdo con estos datos, la premisa de partida defendida por muchos, según la cual Cdk2 es esencial en el control de la duplicación centrosómica, debería tomarse con cierta cautela, ya que, aunque no podemos asegurar que Cdk2 en condiciones normales no desempeñe un papel en este proceso biológico, sí podemos decir que su participación es cuanto menos dispensable.

6.1.7 Fosforilación de Rb en MEFs Cdk2^{-/-}

Posiblemente uno de los sustratos mejor caracterizados de Cdk2 sea la proteína del retinoblastoma, Rb. La inactivación de esta proteína por fosforilación Cdk/ciclina dependiente, es requisito necesario para la transición G1-S del ciclo de división celular, ya que, distintos factores de transcripción hasta entonces silenciados por la actividad represora de Rb, quedan libres para activar la expresión de genes requeridos en la progresión del ciclo. Mediante estudios *in vitro* basados en el análisis de mapas fosfopeptídicos de la proteína del retinoblastoma, se han identificado sitios de fosforilación más o menos específicos de los distintos complejos Cdk-ciclina. Así por ejemplo, mientras que los residuos Thr826 y Thr821 de Rb son fosforilados de manera específica por los complejos Cdk4-Ciclina D y Cdk2-ciclina E/A respectivamente, la Thr795 es diana de ambos heterodímeros. Con esta información decidimos comprobar el estado del residuo Thr 821 en las células Cdk2^{-/-} y ver si existía algún cambio en su patrón de fosforilación. Obtuvimos extractos proteicos de MEFs Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-} que se encontraban creciendo tanto sincrónica como asincrónicamente y analizamos por western blot la fosforilación de Rb a nivel de la Thr821. En ambas condiciones y con independencia del genotipo, pudimos comprobar la incorporación de grupos fosfato en este residuo, sin bien, en el caso de los cultivos sincrónicos, por tratarse de MEFs próximos a la senescencia, la fosforilación se encontraba algo retrasada en ausencia de Cdk2 (Fig26).

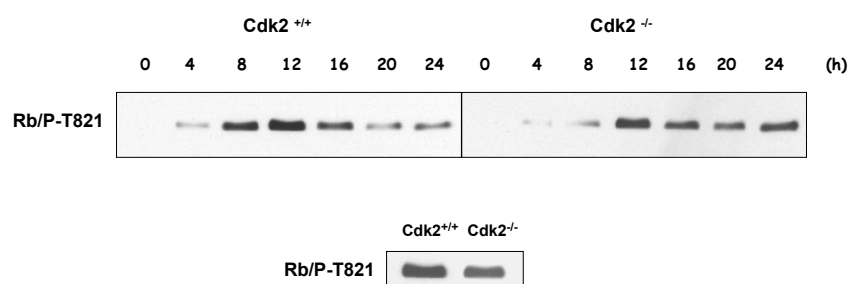


Figura 26. Análisis de la fosforilación del residuo T821 de Rb en MEFs Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-} en crecimiento sincrónico (paneles superiores) y asincrónico (panel inferior).

Esto parece indicar que, o bien otras combinaciones Cdk-ciclina no testadas hasta la fecha son capaces de fosforilar este residuo en condiciones normales (luego no existiría tanta especificidad), o bien, en ausencia de Cdk2, se ponen en marcha mecanismos compensatorios (p.e. unión de otras Cdk a las ciclinas E y A) que asumen esta función.

6.1.8 Efecto del daño al ADN en MEFs Cdk2^{-/-}

El daño infringido al ADN por la acción de agentes genotóxicos de origen diverso, activa determinadas rutas de señalización celular que en algunas ocasiones conducen a una parada proliferativa. Este bloqueo en el ciclo de división celular permite a las células reparar los daños ocasionados en el material genómico y de este modo, salvaguardar su integridad genética. Sin embargo, en algunos tipos celulares, a veces se desencadenan respuestas apoptóticas cuya finalidad, aunque más drástica, es la misma: evitar el riesgo de generar una progenie genéticamente alterada. Posiblemente, distintos factores como la naturaleza del agente genotóxico, la dosis y el tiempo que las células permanezcan expuestas, el tipo celular estén detrás de este comportamiento dual. Aunque no se conoce con exactitud la cantidad de puntos a lo largo del ciclo en los que puede detenerse una célula dañada, uno de los mejor caracterizados es el de parada en G1. Este checkpoint, o punto de control, depende del gen supresor p53 que media la transactivación de múltiples genes, entre ellos p21. De hecho, células deficientes en p21 o p53 son prácticamente incapaces de detener su proliferación cuando sufren daños en su material genómico. En condiciones fisiológicas normales, se ha comprobado cómo esta parada en G1 dependiente de p21, lleva aparejada una disminución de la actividad quinasa asociada a Cdk2 y una acumulación de Rb hipofosforilado. Con objeto de analizar la contribución real de Cdk2 al checkpoint de G1, estudiamos la respuesta celular de MEFs control y mutantes ante la presencia de dos agentes genotóxicos: etopósido y radiación gamma.

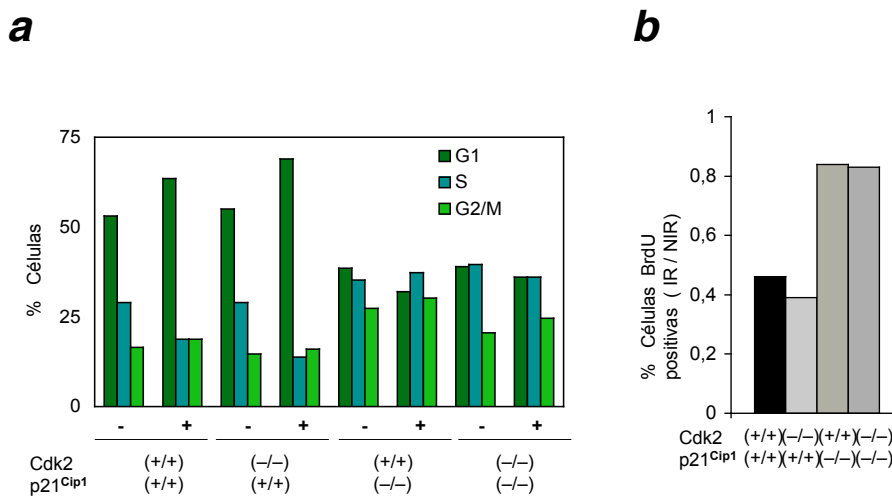


Figura 27. a) Distribución a lo largo del ciclo celular de las distintas poblaciones celulares de los genotipos señalados tras haber sido sincronizadas y sujetas (+) o no (-) a radiación ionizante de 10 Gys. **b)** Determinación del % de células positivas para BrdU bajo condiciones de irradiación. Los valores aparecen normalizados con los relativos a las respectivas poblaciones no tratadas.

Cultivos celulares de MEFs sincronizados en Go fueron irradiados en suspensión con una dosis de 10 Gys y forzados a reentrar nuevamente en ciclo mediante la adición de medio fresco con 10% de suero fetal. Al mismo tiempo que estimulábamos el cultivo aprovechamos también para dar un pulso de BrdU. 24 horas más tarde recogimos las células y analizamos por citometría de flujo su distribución a lo largo de cada una de las fases del ciclo. Sorprendentemente, los MEFs $Cdk2^{-/-}$, al igual que los $Cdk2^{+/+}$, presentaban una reducción del 60% en el número de células positivas para BrdU al compararlos con las muestras control sin irradiar (Fig.27). En paralelo irradiamos MEFs $p21^{-/-}$ en los que pudimos comprobar, como cabía esperar, una disminución más discreta (20% aproximadamente) (Fig.27). La tinción con yoduro de propidio reveló un aumento del 10-15% en G1 de los MEFs irradiados comparados con los control y con independencia del genotipo (Fig.27). Estas dos evidencias demostraban que la funcionalidad de este checkpoint no se encontraba comprometida por la falta de Cdk2, al contrario de lo que sucedía en los MEFs sin p21. Aunque menos probable, no podíamos descartar la posibilidad de que al igual que sucedía en la meiosis, Cdk2 fuera esencial en este proceso biológico concreto. Por tanto, la inhibición de la actividad Cdk2 que se produce tras la inducción de p21 podría considerarse equivalente a un contexto genético sin Cdk2 y ser la causa de la parada del ciclo. Aceptando esta hipótesis, deberíamos esperar que MEFs sin p21 y Cdk2 dejaran de proliferar tras ser irradiados. Sin embargo, al igual que sucedía con el mutante sencillo de p21, estas células doblemente defectivas son también insensibles a la parada celular en G1 en respuesta a un daño en su ADN (Fig.27). Excluida esta posibilidad podemos concluir que, o bien el mecanismo inhibitorio empleado por p21 para detener el ciclo de división celular no incluye sólo a Cdk2, o bien, no existe tal participación de Cdk2 en este proceso y las evidencias hasta la fecha descritas no eran más que consecuencias indirectas de la parada del ciclo por otros mecanismos diferentes. Una tercera explicación tampoco descartable sería la puesta en marcha de mecanismos compensatorios en ausencia de esta quinasa.

Todos estos resultados se confirmaron con cultivos asincrónicos irradiados y tratados con etopósido, otro agente genotóxico que además de producir rotura de doble cadena en el ADN (igual que la irradiación gamma), inhibe también la actividad topoisomerasa, importante para una correcta replicación del material genómico. La irradiación de MEFs $p21^{-/-}$, con independencia de que Cdk2 estuviera o no presente, conducía a una reducción mínima en el número de células en fase S y a una acumulación preferencial en G2 (Fig.28). Por el contrario, en MEFs irradiados $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$, la disminución de la fase S del ciclo fue más dramática y la mayoría de las células se encontraban distribuidas por igual entre G1 y G2 (Fig.28). Completando esta observación, cuando se cuantificó la población de células BrdU positivas, se detectó una reducción mucho más drástica en los MEFs $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$ (60% con respecto al control sin irradiar) que en aquellos $p21^{-/-}$, con independencia de que se expresara o no Cdk2 (30-35%) (Fig.28). De acuerdo con esto, mientras que el checkpoint de G1 es p21-dependiente y Cdk2 independiente, la parada en G2 no parece depender de ninguno de estos dos productos

génicos. Finalmente, el tratamiento con etopósido contribuyó a validar todos estos resultados observándose un bloqueo mayoritario del ciclo durante G2 en todos los genotipos estudiados, mientras que la parada en G1 no se producía cuando se anulaba la expresión de p21 (Fig.28).

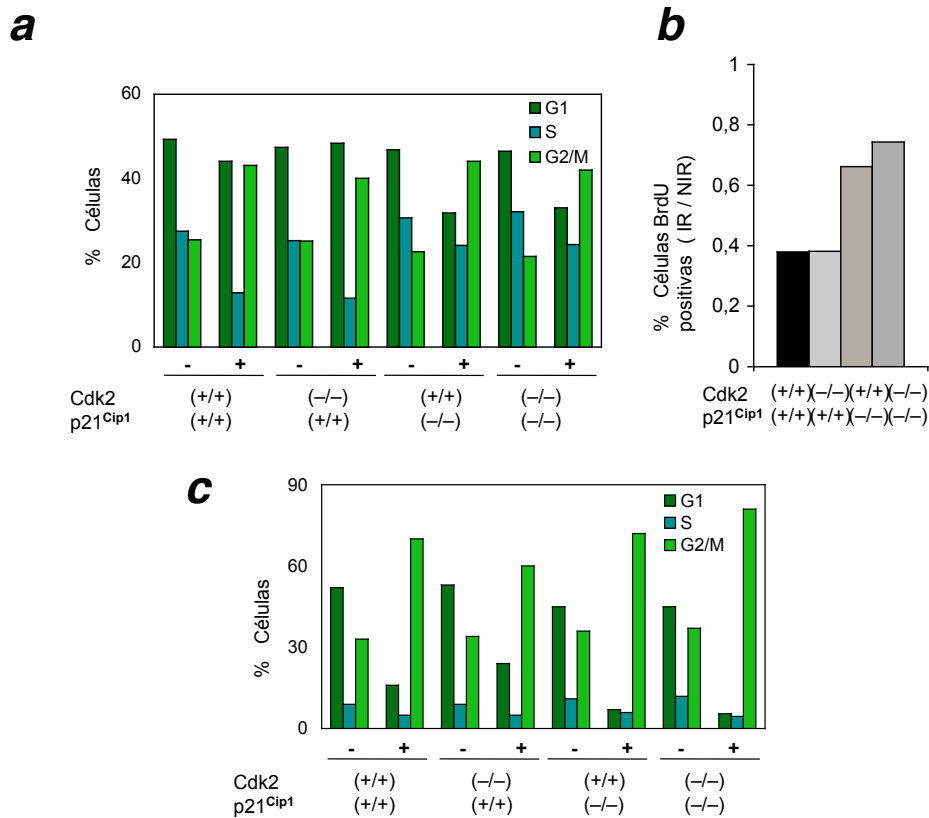


Figura 28. a y b) Idem figura 27 pero con células creciendo asincrónicamente. **c)** Tratamiento con (+) o sin (-) etopósido de MEFs primarios asincrónicos y análisis de la respuesta proliferativa.

6.2 Implicación de Cdk2 en el proceso de tumorigénesis

Las Cdk2s de G1, junto con sus respectivas ciclinas, juegan un papel importante como conectores básicos entre el ciclo de división celular y las distintas rutas de señalización activadas en respuesta a toda una pléyade de estímulos tanto exógenos como endógenos. Así, mediante la integración de toda esta información intra y extracelular, las células consiguen coordinar de un modo eficiente y seguro su ciclo vital y afrontar con bastantes garantías posibles cambios ambientales o fallos de índole más mecánico. Las alteraciones registradas en el funcionamiento de numerosos proto-oncogenes, como Ras, y genes supresores de tumores, p.e. p53, conducen a una situación de estimulación mitogénica persistente o de insensibilidad a insultos antiproliferativos que desajustan todo ese proceso de integración de señales en el que intervienen algunas Cdk2s. La alteración de estas rutas de señalización celular en las que participan los proto-oncogenes y los genes supresores, converge en la maquinaria que controla las numerosas transiciones que se suceden a lo largo del ciclo celular, perturbando el ritmo proliferativo normal y en último término, alterando el funcionamiento de algunos de los puntos

de control (checkpoint) repartidos por todo el ciclo. En este escenario podría resultar interesante comprobar si la falta de Cdk2, como componente de la maquinaria que participa en el control del ciclo celular, podría ayudar a neutralizar, o al menos amortiguar, el fenotipo tumoral inducido por una alteración en la expresión de distintos genes supresores y proto-oncogenes. Utilizamos 3 aproximaciones diferentes con objeto de examinar el impacto de la eliminación de Cdk2: I) inducción tumoral en piel mediante el uso del carcinógeno DMBA (estrategia química) II) combinación de nuestro modelo de ratón Cdk2^{-/-}, con otros dos modelos tumorales, p53^{-/-} y MMTV-Nras (estrategia genética) III) ensayo *in vitro* de formación de focos mediante la introducción de los oncogenes HRas/E1A

6.2.1 Tratamiento químico de carcinogénesis en piel

Es éste un protocolo bastante bien establecido, basado en una única aplicación tópica del carcinógeno DMBA (0,5 mg) y repetidas aplicaciones a lo largo de 3 meses, también sobre la piel, de un mitógeno TPA (15 µg semanales repartidos en 2-3 aplicaciones). La administración de TPA estimula la proliferación y favorece la selección clonal de aquellos eventos transformantes (principalmente mutaciones en Ras) que reportan una ventaja proliferativa a las células que los poseen. Durante todo el tiempo que el animal se mantiene con vida, se realiza un seguimiento basado en la medición del tamaño de las lesiones, desde su aparición como papilomas, hasta su malignización como carcinomas, 7 meses – 1 año después de iniciado el experimento. Aprovechando la ventaja de contar con dos modelos diferentes para Cdk2, el Knock-out clásico y el condicional, establecimos 2 aproximaciones distintas, una preventiva y otra terapéutica.

6.2.1.1 Estrategia preventiva de validación de Cdk2 como posible diana antitumoral

Con este primer abordaje pretendíamos responder a la siguiente pregunta: ¿confiere la ausencia en origen de Cdk2 algún tipo de resistencia a la aparición o desarrollo de tumores?. Es decir, podría ocurrir que la pérdida de Cdk2, sin descartar que eliminara por completo la aparición tumoral, contribuyera a dilatar el periodo de latencia o a rebajar la incidencia de carcinomas. Para ello sometimos a 20 animales Cdk2^{+/+} y 20 animales Cdk2^{-/-} al protocolo de carcinogénesis en piel detallado en el apartado anterior. Aunque el tiempo al que se empezaron a contabilizar papilomas fue el mismo en ambos grupos (12 semanas post-aplicación de DMBA), el número de papilomas y la proporción de aquellos con mayores dimensiones, fue disminuyendo ligeramente con el paso de las semanas en los animales Cdk2^{-/-} comparados con sus hermanos de camada Cdk2^{+/+}. Así, en la semana 24 pasábamos de casi 5 papilomas/ratón en el grupo control con un 11 % del total mayores de 6mm a, aproximadamente, 3 papilomas/ratón en los animales Cdk2^{-/-} con tan sólo un 2% por encima de los 6 mm (Fig.29). La secuenciación de los productos de PCR que amplificaban la región más frecuentemente mutada de HRas (codon 61), reveló la presencia de la mutación en un 85,7% de los tumores Cdk2^{+/+} y en un porcentaje parecido, 87,7% de los tumores procedentes de animales Cdk2^{-/-}. Esta diferencia detectada en términos de número y tamaño tumoral,

desafortunadamente, no se reflejó en los resultados del análisis anatomopatológico que arrojó porcentajes muy similares de carcinomas invasivos: 42% en animales $Cdk2^{+/+}$ vs. 49% en ratones $Cdk2^{-/-}$ (Fig.31).

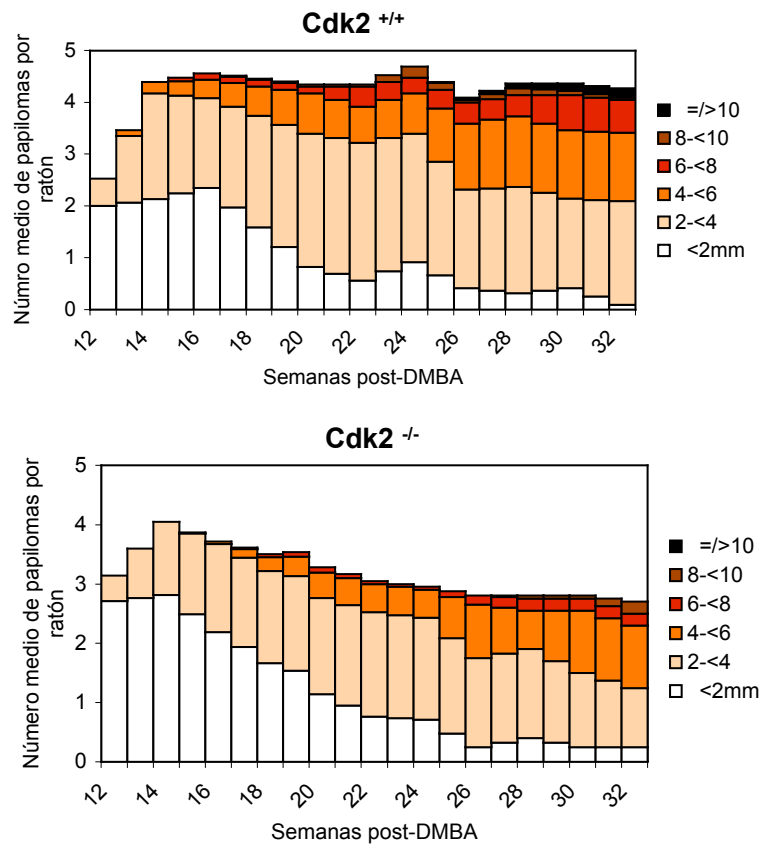


Figura 29. Estrategia preventiva.

6.2.1.2 Validación terapéutica de la eliminación de Cdk2 en el desarrollo tumoral

Con esta segunda estrategia quisimos comprobar si la eliminación de esta quinasa en un tumor incipiente es capaz de revertirlo o bien decelerar su tasa de crecimiento. Para ello, animales portadores de la mutación condicional de Cdk2 y del sistema inducible de la recombinasa Cre, $Cdk2^{lox/lox}$; $RERT^{ert/ert}$, junto con sus respectivos controles, $Cdk2^{+/+}$; $RERT^{ert/ert}$, fueron sometidos, al igual que en el caso anterior, al mismo protocolo de carcinogénesis en piel. Cuando detectamos la aparición de los primeros papilomas (12 semanas en los dos casos), inyectamos 4-OHT por vía intraperitoneal a animales de ambos grupos a fin de inducir la escisión de Cdk2 en los ratones portadores de los alelos condicionales de Cdk2. La administración de tamoxifen duró 4 meses y se realizó 3 veces por semana (1,5 mg semanalmente). Finalizado el tratamiento sacrificamos un animal y analizamos la escisión de Cdk2 en varios papilomas. Desafortunadamente no encontramos eficiencias superiores al 70% que aconsejaban continuar el tratamiento (Fig.31). Sin embargo,

considerando que el porcentaje de escisión de Cdk2 no disminuía con el paso del tiempo y dada la dificultad en la manipulación de los animales por la presencia de papilomas y heridas ulcerosas en la zona de aplicación del carcinógeno, decidimos interrumpir las inyecciones de tamoxifén en este punto.

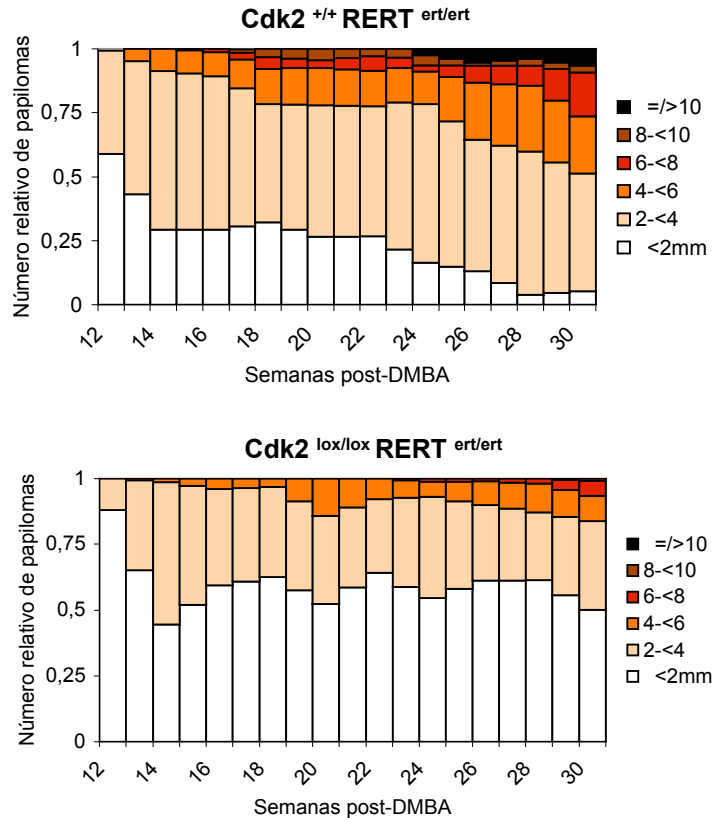


Figura 30. Estrategia terapéutica

Aunque no pudimos observar una reducción en el número de papilomas, más elevado incluso en los animales condicionales (sobre todo durante las últimas semanas del experimento), la distribución por tamaños sí estaba claramente alterada con respecto al grupo control. Mientras que en la semana 30 el porcentaje de tumores mayores de 6mm alcanzaba el 25% en el grupo control, en los ratones $Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$, no superaba el 6,5 % (Fig.30). Sin embargo, la incidencia de carcinomas invasivos era algo superior en este último grupo (12% vs. 8% en el control) (Fig.31). Por lo que respecta a los carcinomas no invasivos, esta diferencia se acentuaba bastante más con valores mayores en los ratones control (37%) que en los condicionales (12%) (Fig.31). Finalmente comprobamos el estado de HRas a nivel del codón 61 que resultó estar mutado en el 100% de los tumores analizados procedentes de ambos genotipos.

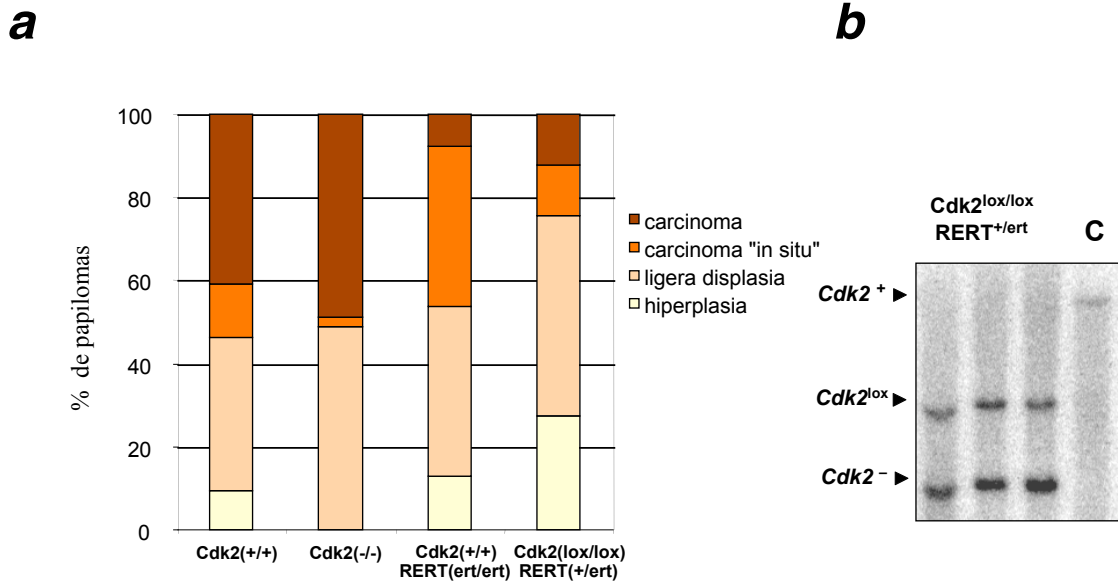


Figura 31. a) Clasificación anatomopatológica de las lesiones tumorales examinadas. b) Análisis por Southern blot de la eficiencia de escisión de Cdk2 en papilomas procedentes de animales con los genotipos indicados. C hace referencia a papilomas de animales control Cdk2^{+/+} RERT^{ert/ert}.

6.2.2 Efecto de la falta de Cdk2 en dos contextos tumorales: p53^{-/-} y MMTV-Nras

La generación de ratones deficientes en p53 fue una de las primeras en conseguirse (comienzo de la década de los 90) debido a 2 razones fundamentales: la importancia ampliamente avalada de p53 en el mantenimiento de la integridad genética de las células y por el mayor conocimiento que de este gen se tenía al tratarse del primer gen supresor en ser identificado (1979). Animales p53^{-/-} desarrollan tumores a edades muy tempranas. Así, con sólo 6 semanas, el 75% ha desarrollado algún tipo de tumor muriendo 3-4 meses más tarde. Los linfomas de tipo T son los tumores mayoritarios, si bien se han observado también linfomas de tipo B, sarcomas de tejido blando, osteosarcomas y teratomas testiculares entre otros. Los heterocigotos de p53 son también susceptibles de desarrollar tumores pero con un tiempo de latencia más prolongado. Aunque es raro observar neoplasias antes de los 9 meses, a los 18 meses, entre el 50 y el 60% presentan ya algún cuadro neoplásico y 6 meses más tarde la supervivencia del animal es bastante improbable. El espectro tumoral de estos ratones difiere del de los p53^{-/-} predominando los osteosarcomas y sarcomas de tejido blando sobre los linfomas. Además, la incidencia de carcinomas es mayor en los animales p53 heterocigotos. Por otro lado, la presencia de p53 en heterocigosis reproduce más fielmente, aunque con alguna que otra excepción, tanto la tipología como la incidencia tumoral observada en pacientes con síndrome de Li – Fraumeni. Es interesante señalar que esta haploinsuficiencia de p53 es suficiente por sí misma para promover el desarrollo tumoral, ya que en un 50 % de los tumores obtenidos a partir, tanto de pacientes humanos con Li – Fraumeni como de ratones

p53 $+/$ -, se comprobó la preservación de una copia funcional del gen. Para estudiar el efecto de la falta de Cdk2 en un escenario de ausencia total o parcial de p53, obtuvimos tras varias rondas de cruces, animales $Cdk2^{-/-};p53^{+/-}$ y $Cdk2^{-/-};p53^{-/-}$, que cuando los comparamos con sus respectivos controles, $Cdk2^{+/+};p53^{+/-}$ y $Cdk2^{+/+};p53^{-/-}$, eran idénticos tanto en supervivencia como en el espectro tumoral que presentaban en el momento de su muerte. La única diferencia la encontramos en la esterilidad característica asociada a la falta de Cdk2 y que no se revertía con el déficit de todas o una de las copias de p53. Así, los mutantes homocigotos para ambos genes morían en el 71% de los casos antes de los 5 meses de edad y debido a linfomas de células T, idéntica situación a la registrada en el caso de los controles $Cdk2^{+/+};p53^{-/-}$ que morían, también por linfomas T, en el mismo periodo de tiempo y en un porcentaje similar (67%) (Fig.32). Respecto a los ratones $Cdk2^{-/-};p53^{+/-}$, aunque con una supervivencia más dilatada en el tiempo que los anteriores, su comportamiento no difería del de sus hermanos de camada $Cdk2^{+/+};p53^{+/-}$. Ambas cohortes morían a la misma edad con el mismo espectro tumoral (osteosarcomas y sarcomas de tejido blando) y en porcentajes muy similares. Así con 18 meses había fallecido el 78% de los ratones $Cdk2^{-/-};p53^{+/-}$ frente al 87% de los controles (Fig.32).

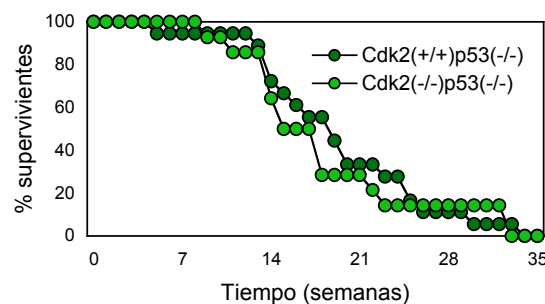
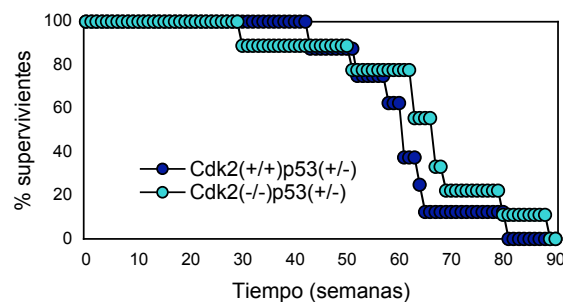
a**b**

Figura 32. Curva de supervivencia de animales defectivos en p53 (a) o heterocigotos para la mutación deletérea (b) en presencia o ausencia de Cdk2.

Obtuvimos igualmente fibroblastos embrionarios $Cdk2^{+/+};p53^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p53^{-/-}$ a partir de embriones a 13 d.p.c y los pusimos en cultivo sometiendo al protocolo 3T3 de immortalización. Está descrito en la literatura que la eliminación de p53 es suficiente para

conferir a las células propiedades inmortalizantes desde pases tempranos. ¿Podría la falta de Cdk2 anular esta propiedad? Comprobamos que al igual que sucedía *in vivo*, la falta de p53 era dominante y las células homocigotas para ambas mutaciones crecían también exponencialmente desde el mismo momento que fueron puestas en cultivo, sin atravesar por ninguna etapa de crisis (Fig.33). Confirmamos este fenotipo con dos tipos de suero diferentes, FBS y CS, este último con un menor efecto mitogénico.

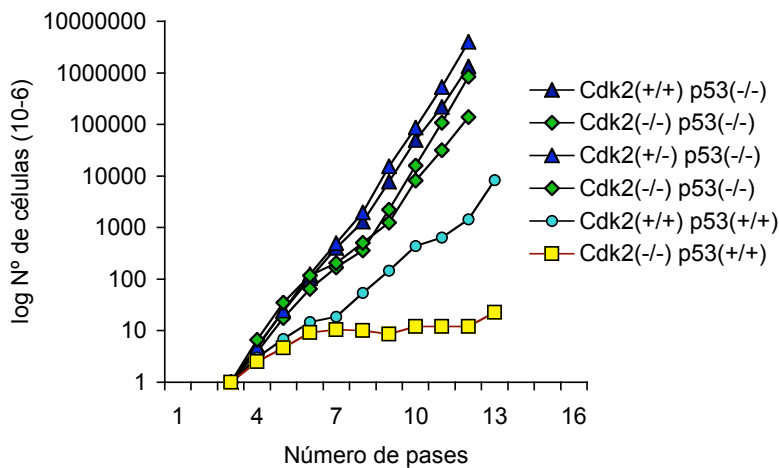


Figura 33. Ausencia de efectos proliferativos tras la eliminación de Cdk2 en la inmortalización de MEFs p53^{-/-}

Nos preguntamos si esta incapacidad de Cdk2, cuando se encontraba ausente, de contrarrestar el desarrollo tumoral, era extensible a otros contextos tumorales. Por cruces con ratones transgénicos MMTV-Nras, que expresaban el proto-oncogen Nras bajo el control del promotor MMTV, generamos ratones Cdk2^{-/-};MMTV-Nras^{+T}. El 50 % de estos animales, al igual que los que expresan el transgen en presencia de Cdk2, mueren alrededor de el primer año de vida, principalmente por linfomas, y en menor medida, por tumores de mama. No observamos al igual que en el caso de p53, cambios en la supervivencia ni en el espectro tumoral comparados con el grupo control (Fig.34).

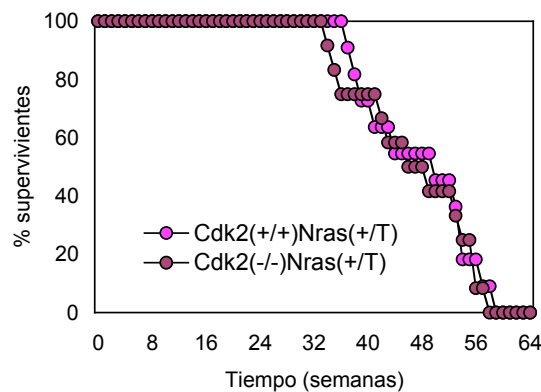


Figura 34. Curva de supervivencia de animales Nras^{+T} en un fondo genético desprovisto o no de Cdk2

6.2.3 Susceptibilidad a la transformación por Ras/E1A de MEFs $Cdk2^{-/-}$ y $Cdk2^{lox/lox}$

La réplica *in vitro* de todos estos experimentos y que confirmaba las mismas evidencias que arrojaban los datos *in vivo* con modelos animales, consistió inicialmente en la sobreexpresión de la combinación oncogénica HRas/E1A, en MEFs primarios $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$. Aunque Ras por sí solo es incapaz de transformar células primarias, estímulos oncogénicos adicionales como sobreexpresión de Myc, ciclina D, dominantes negativos de p53..... así como ciertas oncoproteínas virales (E1A, E7, el antígeno T del virus SV40....) cooperan con Ras y conducen a la transformación celular. Pues bien, la introducción de estos dos oncogenes resultaba en la generación de un número muy similar de focos en ambos genotipos (15 en $Cdk2^{-/-}$ vs. 18 en $Cdk2^{+/+}$), fácilmente identificables por su refringencia y morfología fusiforme (Fig.35). Concluimos por tanto que, la susceptibilidad a la transformación celular en respuesta a los oncogenes Ras y E1A se mantiene prácticamente invariable en ausencia de Cdk2.

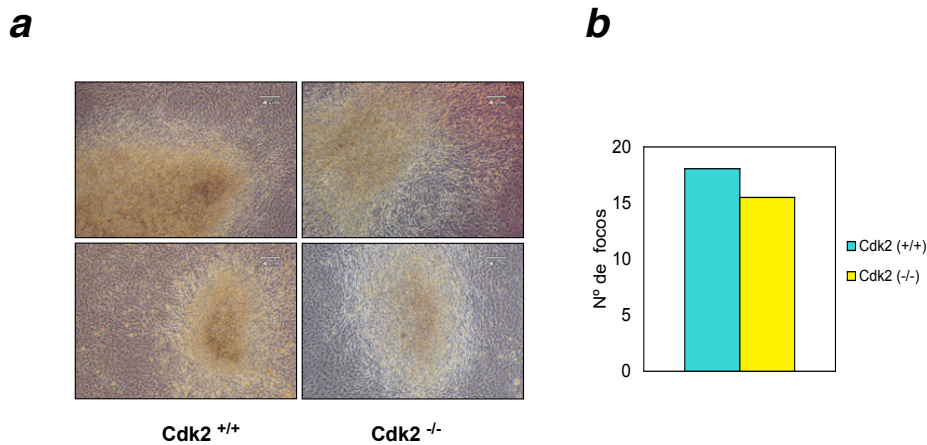


Figura 35. a) Morfología de diversos focos resultantes de la transformación con el tándem Ras/E1A de MEFs primarios $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$. **b)** Análisis cuantitativo del número de focos en ambos fondos genéticos.

En una segunda aproximación se decidió analizar, de un modo similar al modelo *in vivo* de validación terapéutica ya descrito, el efecto que la pérdida súbita de Cdk2 pudiera conllevar al crecimiento de células transformadas.

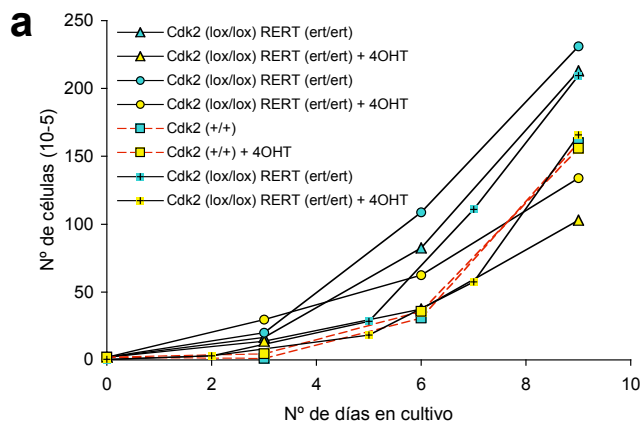
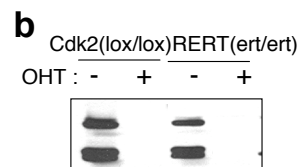


Figura 36. a) Curva de crecimiento de MEFs transformados $Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ en presencia o ausencia de 4OHT. **b)** Análisis de los niveles de Cdk2 por western blot al cabo de 9 días de tratamiento con 4OHT.



Para ello MEFs $Cdk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ se transfectaron con la combinación oncogénica HRas/E1A. Transcurridas 3 semanas los focos emergentes fueron picados de forma individualizada, crecidos y expandidos. Finalmente se determinó la capacidad proliferativa de cada uno de ellos en presencia o ausencia de 4-OHT a fin de inducir o no la inactivación genética de Cdk2. Los resultados indicaban que la eliminación repentina de Cdk2 ralentizaba ligeramente el crecimiento celular, lo que revela posiblemente la puesta en marcha de mecanismos de adaptación al nuevo contexto genético que no entrarían en funcionamiento con la misma rapidez y eficacia en todas las células (Fig.36).

6.3 Estudio del efecto de las propiedades citostáticas de los supresores tumorales p21 y p27 en ausencia de Cdk2.

6.3.1 Sobreexpresión de p21 y p27 en MEFs $Cdk2^{-/-}$

Numerosos estudios precedentes han demostrado la capacidad de los dos miembros de la familia Cip/kip, p21 y p27, de inhibir la progresión del ciclo celular, conduciendo a un bloqueo del mismo en la fase G1 (Toyoshima y Hunter, 1994; Harper et al., 1995; Tetsu y McCormick, 2003). La inhibición de la actividad quinasa asociada a Cdk2 parece estar detrás de este bloqueo, lo que corroboraría la función supresora tumoral otorgada a estos dos reguladores negativos del ciclo celular. Considerando esta evidencia, decidimos analizar la respuesta celular a la sobreexpresión de p21 y p27, en ausencia de su principal diana molecular, Cdk2. Para ello infectamos MEFs primarios $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$, con retrovirus que expresaban ambos inhibidores.

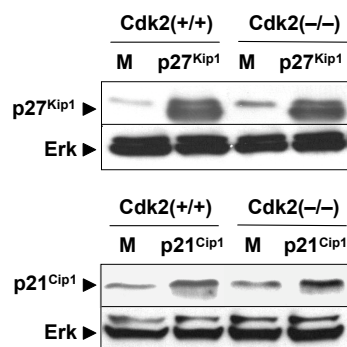


Figura 37. Análisis por western blot de la sobreexpresión de p21 y p27 en MEFs primarios $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$.

Después de 2 días en selección con puromicina y tras un pulso de 9 horas de BrdU, realizamos distintos ensayos proliferativos y bioquímico. Comprobamos que la expresión ectópica de p21 y p27 (Fig. 37) detenía la proliferación celular tanto en presencia como en ausencia de Cdk2. Así, la curva de crecimiento que obtuvimos después de mantener las células en cultivo durante 5 días revelaba una disminución clara del ritmo proliferativo de los MEFs con niveles elevados de ambos inhibidores y con independencia del genotipo (Fig.38). También la incorporación de BrdU se reducía considerablemente con la sobreexpresión de p21 y p27 sin que la falta de Cdk2 alterase este resultado (Fig.38). Al analizar por citometría de flujo

la distribución de las distintas poblaciones celulares a lo largo del ciclo, pudimos comprobar cómo la sobreexpresión de p27 detenía el ciclo mayoritariamente en G1 (Fig.38). Aunque en el caso de los MEFs $Cdk2^{+/+}$ se podría explicar por la inhibición de la actividad Cdk2, en los MEFs $Cdk2^{-/-}$ el mecanismo resulta mucho menos obvio

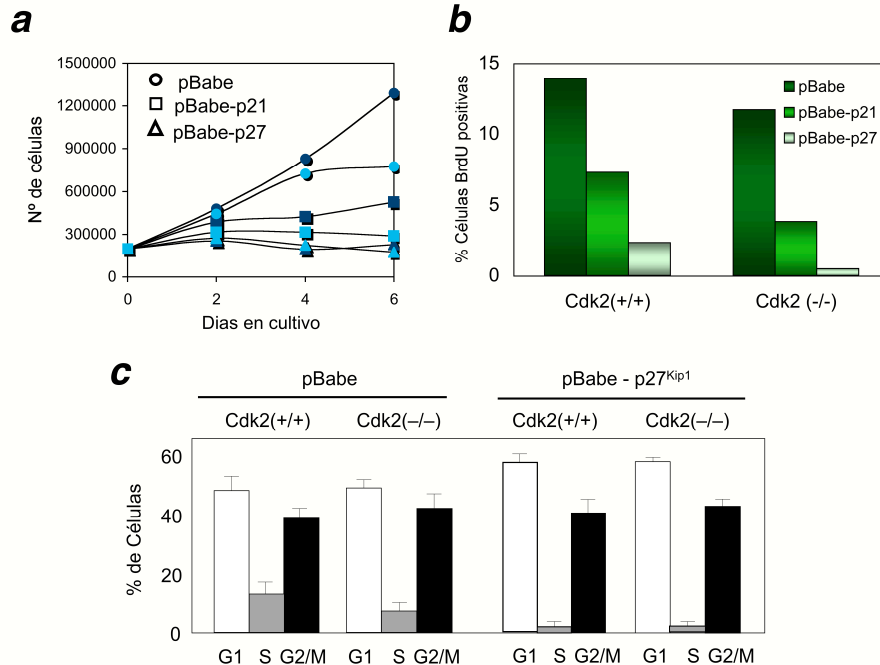


Figura 38. a) Efecto de la sobreexpresión de los inhibidores Cip/kip en el crecimiento de MEFs $Cdk2^{+/+}$ (morado) y $Cdk2^{-/-}$ (azul claro). Análisis cuantitativo de células positivas para BrdU (b) y distribución celular a lo largo del ciclo (c) tras la sobreexpresión de p21 y p27 en un fondo genético con o sin Cdk2.

Con p21 no observamos un bloqueo predominante en ninguna de las fases del ciclo, sino que había un reparto más o menos equitativo entre G1 y G2, quizás algo más favorable hacia esta última en el caso de los MEFs $Cdk2^{-/-}$. De todos modos, la respuesta inhibitoria producida por p21 siempre estuvo por debajo de la conseguida con p27, posiblemente por unos niveles de expresión más reducidos (Fig.37).

A continuación, a fin de investigar el efecto de la sobreexpresión de ambos inhibidores sobre los complejos Cdk-ciclina en ausencia de Cdk2, analizamos la actividad quinasa presente en distintos inmunoprecipitados obtenidos a partir de MEFs $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$. Como era de esperar, la actividad Cdk2 disminuía dramáticamente tras la sobreexpresión de p21 y p27 en MEFs silvestres (Fig.39). De la misma forma, la actividad quinasa asociada a ciclina E, ausente en las células $Cdk2^{-/-}$, se reducía considerablemente en respuesta a ambos estímulos inhibitorios (Fig.39). Por el contrario, la actividad de inmunoprecipitados de Cdk4 obtenidos a partir de extractos control y mutante no se veía afectada por la sobreexpresión de ninguno de los dos inhibidores (Fig.39). Como cabía esperar por estudios anteriores, niveles elevados de p21 y p27 disminuían claramente la actividad quinasa asociada a Cdk1 en MEFs $Cdk2^{+/+}$ (Toyoshima y Hunter, 1994; Harper et al., 1995) (Fig.39). En ausencia de Cdk2, la ya de por sí

reducida actividad Cdk1, se veía totalmente anulada con la sobreexpresión de ambos inhibidores (Fig.39). Un patrón similar lo encontramos al intentar correlacionar estos resultados con los de la ciclina A. Tanto en extractos Cdk2^{+/+} como Cdk2^{-/-} no conseguimos detectar actividad ciclina A en presencia de niveles suprafisiológicos de ambos inhibidores (Fig.39). Aunque no podemos olvidar el efecto inhibitorio que la propia ausencia de Cdk2 tiene sobre los niveles de expresión y actividad de los complejos Cdk1-Ciclina A, todos estos datos sitúan a dichos complejos como dianas moleculares claves de los inhibidores p21 y p27, ofreciendo así, una posible explicación al efecto antiproliferativo encontrado en las células Cdk2^{-/-}.

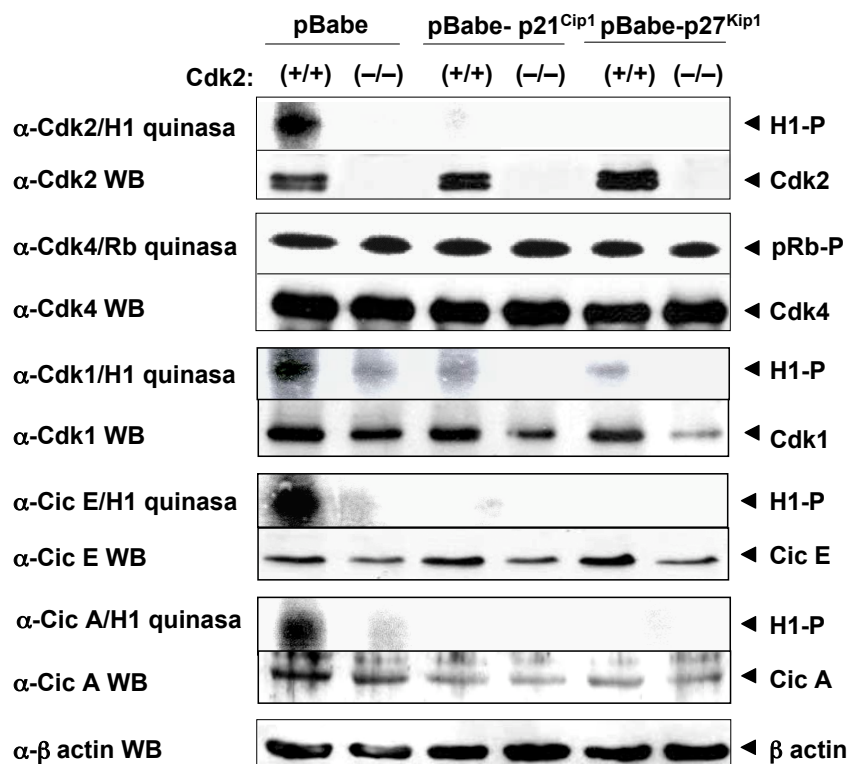


Figura 39. Análisis de los niveles de expresión y actividad quinasa asociada a diversos reguladores de ciclo celular.

6.3.2 Análisis de las consecuencias de la sobreexpresión de formas mutantes de p21 y p27 en ausencia de Cdk2

Con el objeto de profundizar aún más en las interacciones que estarían participando en la actividad inhibitoria de p27 observada en un escenario sin Cdk2, generamos dos mutantes de este supresor tumoral que denominamos p27F64A y p27 3M. En el primero de ellos introdujimos una mutación puntual en el dominio de unión a Cdk que según está descrito reduce la unión de p27 a la subunidad catalítica del complejo Cdk-ciclina, principalmente Cdk2 (Kwon et al., 1998) (Fig.40). En el caso del mutante p27 3M, además de la mutación anteriormente descrita, creamos otros dos cambios puntuales en el dominio de unión a ciclinas basándonos para ello en la homología de secuencia existente entre p27 y p21, molécula esta última en la que se había descrito esta doble mutación adicional (Lin et al., 1996) (Fig.40).

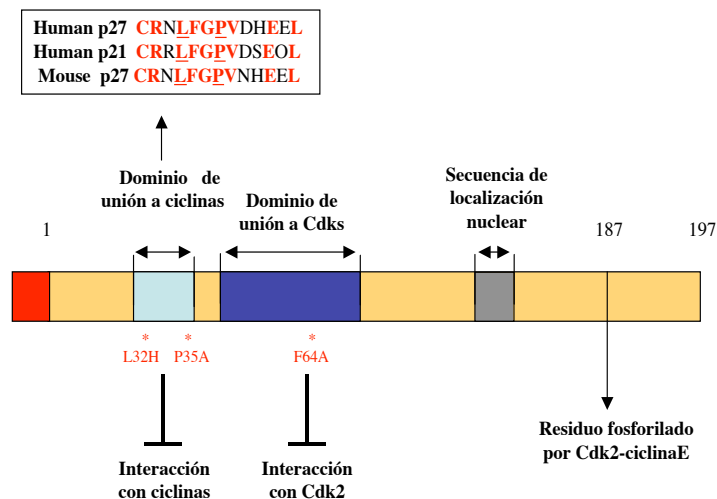


Figura 40. Esquema de la estructura del inhibidor p27 indicándose las alteraciones introducidas por mutagénesis dirigida y la homología de secuencia intra e interespecífica con distintos miembros de la familia Cip/Kip.

En el contexto del mutante sencillo no observamos cambios en la afinidad hacia ninguno de los reguladores de ciclo examinados, cuyos niveles eran idénticos a los que coimmunoprecipitaban con la forma silvestre de p27 (Fig.41). No pudimos comprobar si el hecho de que este mutante pudiera seguir interaccionando con las subunidades reguladoras estaría permitiendo una coimmunoprecipitación indirecta de las Cdk. Confirmando este paralelismo, cuando se analizó la capacidad inhibitoria del mutante sencillo mediante ensayos de incorporación de BrdU, se vio que era prácticamente idéntica a la respuesta antiproliferativa que se conseguía con la forma silvestre de p27 (Fig.41).

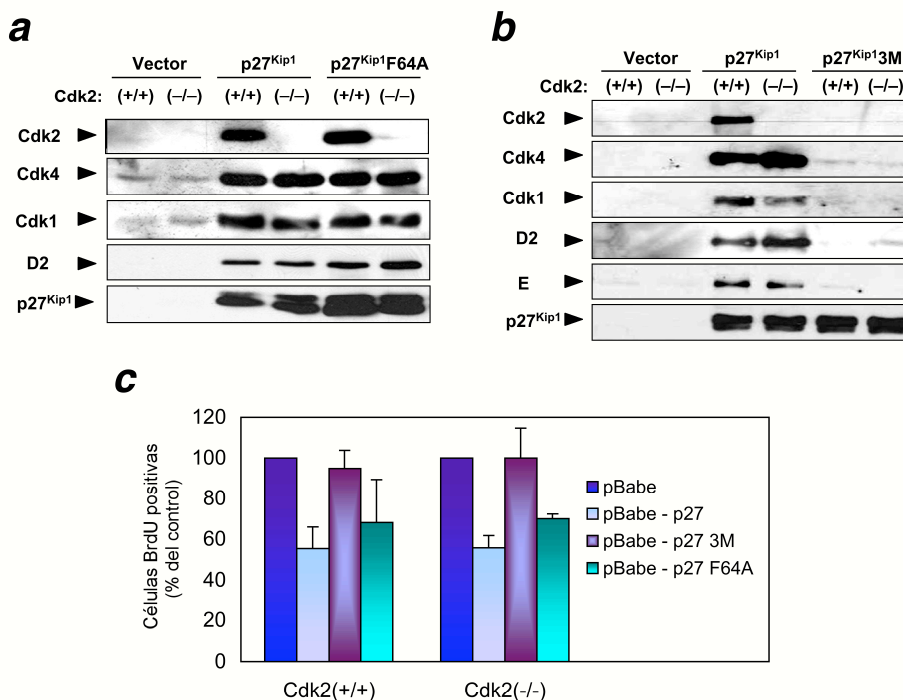


Figura 41. Estudio de las interacciones entre distintos reguladores de ciclo y los mutantes de p27 F64A (a) y 3M (b). Efecto proliferativo de la sobreexpresión de ambos mutantes en MEFs Cdk2^{+/+} y Cdk2^{-/-} (c).

Cuando realizamos todos estos ensayos con el mutante triple, los resultados obtenidos fueron completamente distintos. Mediante ensayos de inmunoprecipitación pudimos comprobar, con independencia del genotipo, la ausencia casi total de interacciones entre este mutante y los distintos complejos Cdk/ciclina examinados (Fig.41). Además, dicho mutante fue incapaz de inhibir la proliferación celular tanto en MEFs Cdk2^{+/+} como Cdk2^{-/-} (Fig.41). Realizamos el ensayo con células primarias e inmortales obteniendo un resultado idéntico. Todas estas observaciones indican la tremenda importancia de las interacciones de p27 con los complejos Cdk/ciclina para el ejercicio de su actividad inhibitoria que es, además, independiente de Cdk2

Sabemos que p21, además de unirse a los complejos heterodiméricos Cdk-ciclina, es capaz de interaccionar con el factor PCNA, impidiendo la unión de éste a la subunidad catalítica de la ADN polimerasa δ y bloqueando de este modo la replicación del ADN. Sin embargo, la sobreexpresión de un mutante de p21 defectivo en su interacción con PCNA, seguía deteniendo el ciclo de división celular con la misma eficiencia que la forma silvestre y con independencia de la expresión de Cdk2 (Fig.42). Este resultado indicaba que PCNA no es la principal diana de p21, al menos en MEFs.

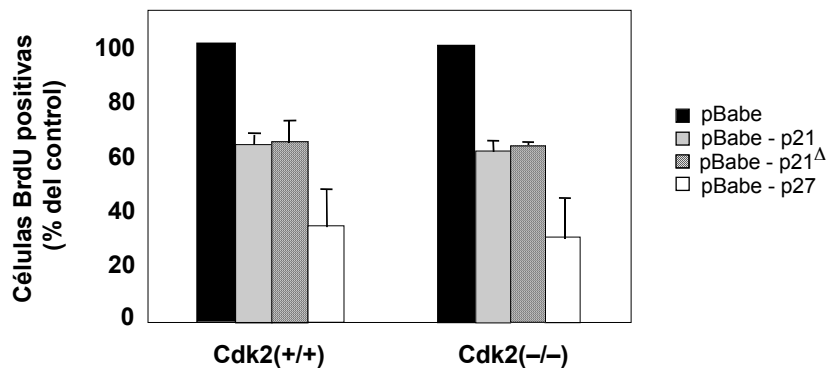


Figura 42. Cuantificación de células positivas para BrdU tras la sobreexpresión de un mutante de p21 defectivo en su interacción con PCNA (p21 Δ).

De los resultados obtenidos con estos estudios concluimos que tanto p21 como p27 ejercen también su actividad inhibitoria a través de su interacción con moléculas diana distintas de Cdk2, muy posiblemente con otros complejos Cdk-ciclina. A este respecto podemos proponer dos posibles hipótesis: p21 y p27 pueden estar modulando excepcionalmente la actividad de la molécula que se encuentra remplazando a Cdk2 o, alternatively, la ausencia de Cdk2 ha puesto de manifiesto otros mecanismos de control que, aunque no excluyen la implicación de Cdk2, sí sirven para minimizar la importancia atribuida a esta quinasa y subrayan aún más la complejidad que gobierna el ciclo de división celular.

6.3.3 Efecto de la ausencia de Cdk2 en la proliferación de MEFs p21^{-/-} y p27^{-/-}

Como indicación genética de la posible relación epistática que pudiera existir entre los inhibidores Cip/kip y Cdk2, examinamos las consecuencias proliferativas de la eliminación de

esta quinasa en células deficientes en p21 o p27.

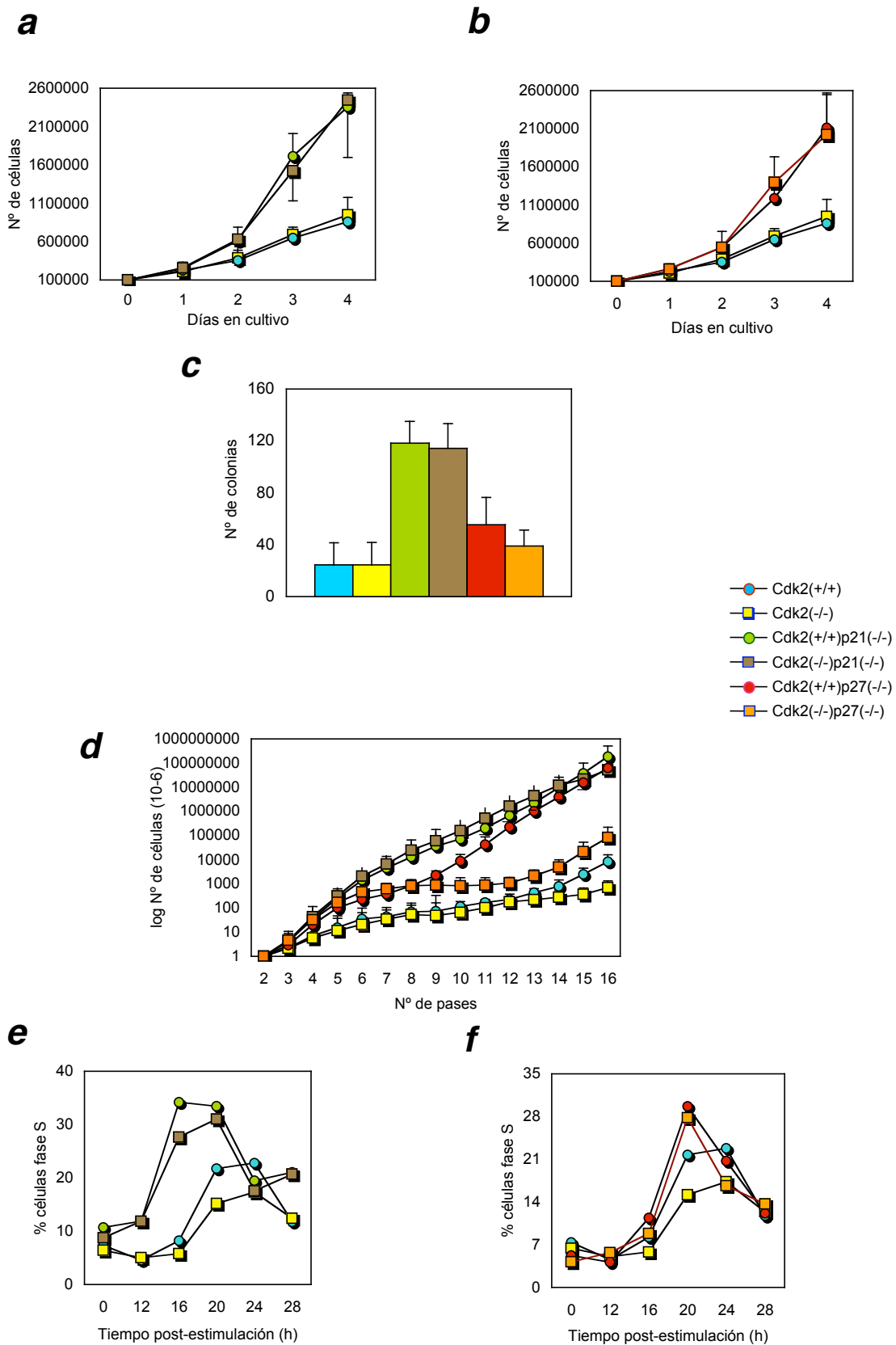


Figura 43. Diferentes ensayos proliferativos realizados en MEFs de genotipos mostrados en la figura: a y b) Curvas de crecimiento. c) Eficiencia de plaqueo. d) Curva de inmortalización. e y f) Cinética de entrada en fase S.

A pases tempranos, MEFs $Cdk2^{-/-};p21^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$ mostraban una tasa de crecimiento similar a la de células $p21^{-/-}$ y $p27^{-/-}$ respectivamente, que por otro lado superaba con claridad la de los controles $Cdk2^{+/+}$ y $Cdk2^{-/-}$ (Fig.43). Tras sucesivos pases en cultivo pudimos comprobar cómo esta ventaja proliferativa se mantenía sobre todo en el caso de los MEFs $Cdk2^{-/-};p21^{-/-}$ y $p21^{-/-}$, que crecían casi exponencialmente desde el principio (Fig.43). Por el contrario, los MEFs $p27^{-/-}$ disminuían su ritmo de crecimiento durante 2-3 pases antes de recuperar sus índices proliferativos iniciales (Fig.43). Esta disminución era mucho más acentuada en el caso de células sin $Cdk2$ y $p27$, las cuales atravesaban por un periodo de crisis más prolongado antes de immortalizarse. Estos datos parecen indicar que, aunque la falta de $Cdk2$ no elimina la ventaja proliferativa observada a pases tempranos por la ausencia de $p21$ o $p27$, en el caso de este último, sí contribuye a dificultar la salida de senescencia, posiblemente por la necesidad de mutaciones immortalizantes adicionales. Resultados muy similares se obtuvieron en el caso de ensayos de eficiencia de plaqueo. Así, frente a las 25 ± 14 colonias contabilizadas en el caso de células control, el conteo en MEFs $p21^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p21^{-/-}$ arrojó números muy superiores con 118 ± 13 y 114 ± 16 colonias respectivamente (Fig.43). Estas diferencias se reducían en el caso de los MEFs $p27^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$ que alcanzaban valores intermedios de $55,5 \pm 20$ los primeros y $39 \pm 12,3$ los segundos (Fig.43). Finalmente, MEFs $p21^{-/-}$ y $p27^{-/-}$ en G0 entraban en fase S, tras ser estimulados con suero, entre 4 y 6 horas antes que las células $Cdk2^{+/+}$ (Fig.43). Comprobamos que esta entrada prematura era independiente de la ausencia o presencia de $Cdk2$, por lo que concluimos que este efecto no estaría mediado por un estado constitutivamente activo de dicha quinasa.

6.3.4 Estudio de la actividad oncogénica por pérdida de los inhibidores Cip/kip en ausencia de $Cdk2$.

MEFs deficientes en $p21$ y $p27$ muestran un ligero aumento en su susceptibilidad a ser transformados *in vitro*. La expresión ectópica de los oncogenes Ras y E1A induce la aparición de un mayor número de focos en fibroblastos $p21^{-/-}$ ($33,7 \pm 7$) y $p27^{-/-}$ (20 ± 7) comparados con las células control (17 ± 8). Cuando estos experimentos se repitieron usando MEFs que carecían de $Cdk2$ además de uno de los dos inhibidores los resultados fueron básicamente los mismos. Así, llegamos a contabilizar 27 ± 5 focos en MEFs $Cdk2^{-/-};p21^{-/-}$ y 23 ± 9 focos en células doblemente defectivas para $Cdk2$ y $p27$. Por tanto, un incremento de la actividad quinasa de $Cdk2$ no explicaría la mayor susceptibilidad a la transformación por Ras/E1A encontrada en ausencia de uno de estos dos inhibidores.

Finalmente con el objeto de estudiar las conexiones genéticas entre los inhibidores Cip/Kip y $Cdk2$ *in vivo*, decidimos analizar el fenotipo de animales doblemente defectivos en $Cdk2$ y $p27$. La falta de $p27$ en el ratón conduce a un incremento en el tamaño corporal así como a una hiperplasia acusada especialmente en aquellos tejidos donde $p27$ es el inhibidor Cip/kip más destacado (timo, bazo, glándula suprarrenal, retina, ovario, testículo y pituitaria). Además se ha

visto cómo los animales $p27^{-/-}$ tienen una predisposición muy alta (penetrancia próxima al 100%) a desarrollar tumores en el lóbulo intermedio de la pituitaria que terminan por causar la muerte del animal alrededor del año de vida. Al igual que los animales $p27^{-/-}$, los dobles mutantes $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$ pesaban entre un 50-60% más que los controles $Cdk2^{+/+}$ y presentaban la misma organomegalia generalizada, indicando esta observación que $Cdk2$ no es necesario en el control de la proliferación mediada por $p27$ (Fig.44).

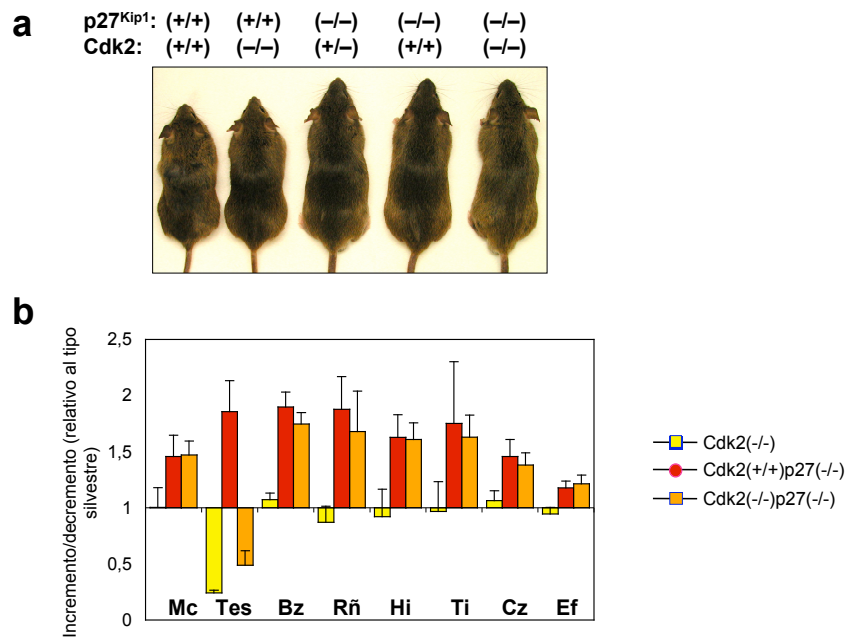


Figura 44. Aumento del tamaño corporal (**a**) y organomegalia de amplio espectro (**b**) en animales $p27^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$. Mc (masa corporal), Tes (testículos), Bz (bazo), Rñ (riñón), Hi (hígado), Ti (timo), Cz (corazón) y Ef (encéfalo).

Los testículos y ovarios de estos animales $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$ presentaban las mismas anomalías descritas que en el caso del mutante sencillo de $Cdk2$. Así, un estudio más detallado de los testículos, reveló una total ausencia de células reproductoras en la luz de los túbulos seminíferos y una elevada respuesta apoptótica similar a la observada en testículos de animales $Cdk2^{-/-}$. Sin embargo la proliferación de las espermatogonias se seguía produciendo con normalidad (Fig.45). Por su parte, en las hembras, los ovarios seguían siendo también atróficos y estaban desprovistos de folículos y cuerpo lúteo. Por tanto, los defectos meióticos debidos a la falta de $Cdk2$ son independientes de $p27$.

Ante la ausencia de $Cdk2$ y $p27$ se seguían manifestando las mismas alteraciones en la arquitectura de la retina, consistentes en la invasión parcial de la capa de conos y bastones por la capa granular externa inmediatamente superior (Fig.46).

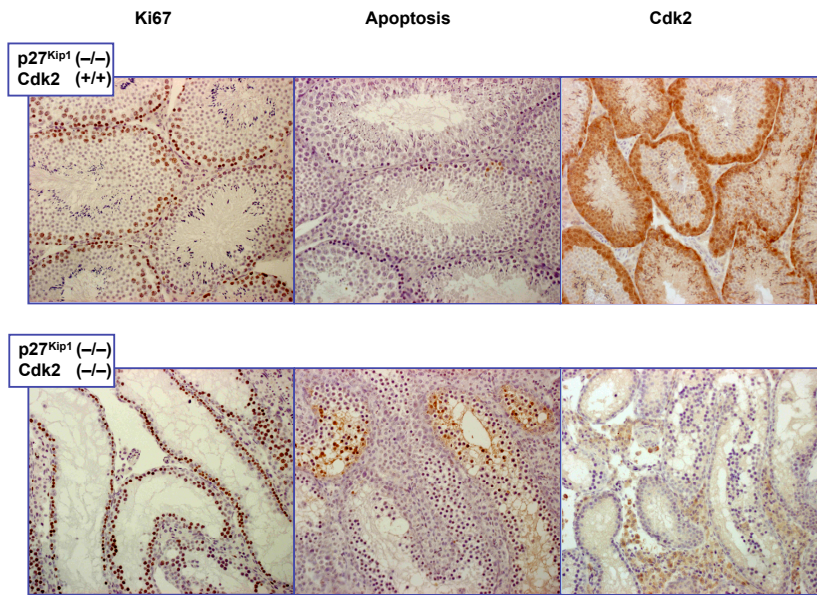


Figura 45. Defectos en la arquitectura tisular de los testículos $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$. La capacidad proliferativa, la respuesta apoptótica y la presencia de Cdk2 en los túbulos seminíferos se determinaron por inmunohistoquímica mediante el uso de los anticuerpos correspondientes.

De igual modo, la tendencia de los mutantes simples $p27^{-/-}$ a desarrollar tumores de pituitaria se extendía también a los animales $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$ con una misma penetrancia (Fig.46). Así, la hiperplasia inicial observada a las 10 semanas de vida en animales de ambos genotipos, se transformaba en neoplasia 14 semanas más tarde (Fig.46). Las pituitarias de estos animales, $p27^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$ de seis meses de edad, eran tumorales con elevados índices proliferativos y volúmenes anatómicos claramente patológicos (Fig.46). Confirmando estos resultados, no encontramos tampoco diferencias en la supervivencia de animales pertenecientes a ambos grupos (Fig.48).

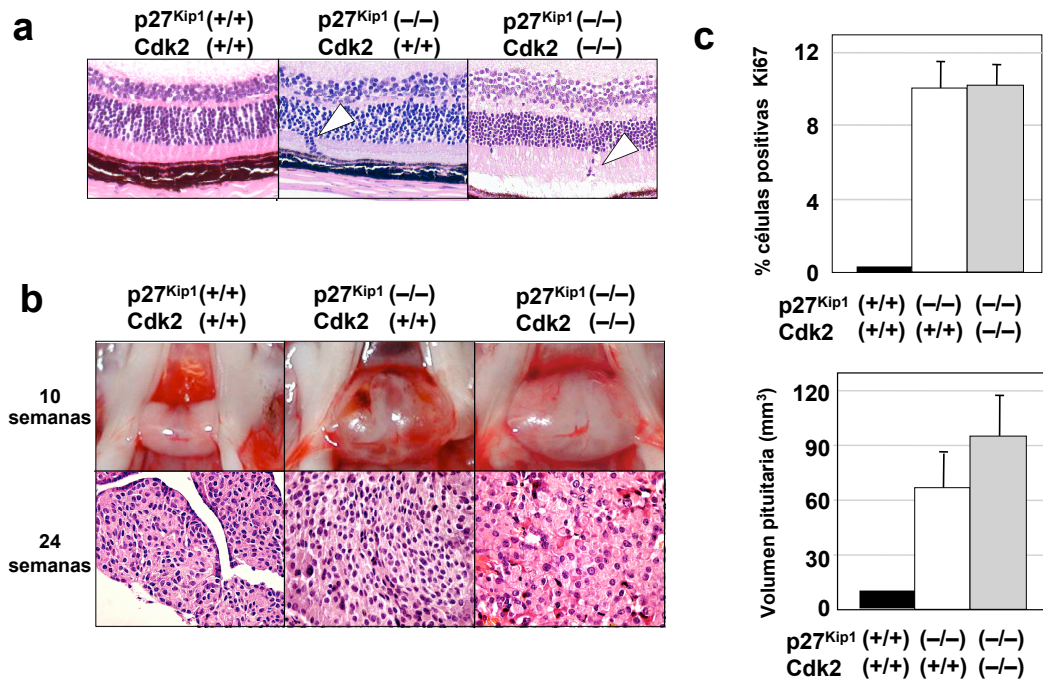


Figura 46. Displasia retiniana (a) y tumores de pituitaria (b) en ratones $p27^{-/-}$ y $Cdk2^{-/-};p27^{-/-}$. Determinación del volumen y de la tasa proliferativa de pituitarias tumorales y control (c).

Finalmente estudiamos las consecuencias de eliminar Cdk2 en un contexto genético desprovisto de p21. Los mutantes sencillos de este regulador de ciclo, en contra de lo esperado, no muestran ningún problema de desarrollo aunque a edades avanzadas tienden a desarrollar tumores con una incidencia superior a los animales control. Los sarcomas histiocíticos, hemangiomas y linfomas de células B, son las neoplasias mayoritariamente encontradas en estos animales. Cuando trasladamos estos estudios a ratones $Cdk2^{-/-};p21^{-/-}$ comprobamos que tanto la tasa de supervivencia como el espectro tumoral eran idénticos a los del grupo que carecía de p21 (Fig.48). Tan sólo los defectos meióticos ligados a la ausencia de Cdk2 aparecen como fenotipos añadidos. Tanto los testículos como los ovarios son atróficos y carecen de células germinales (Fig.47).

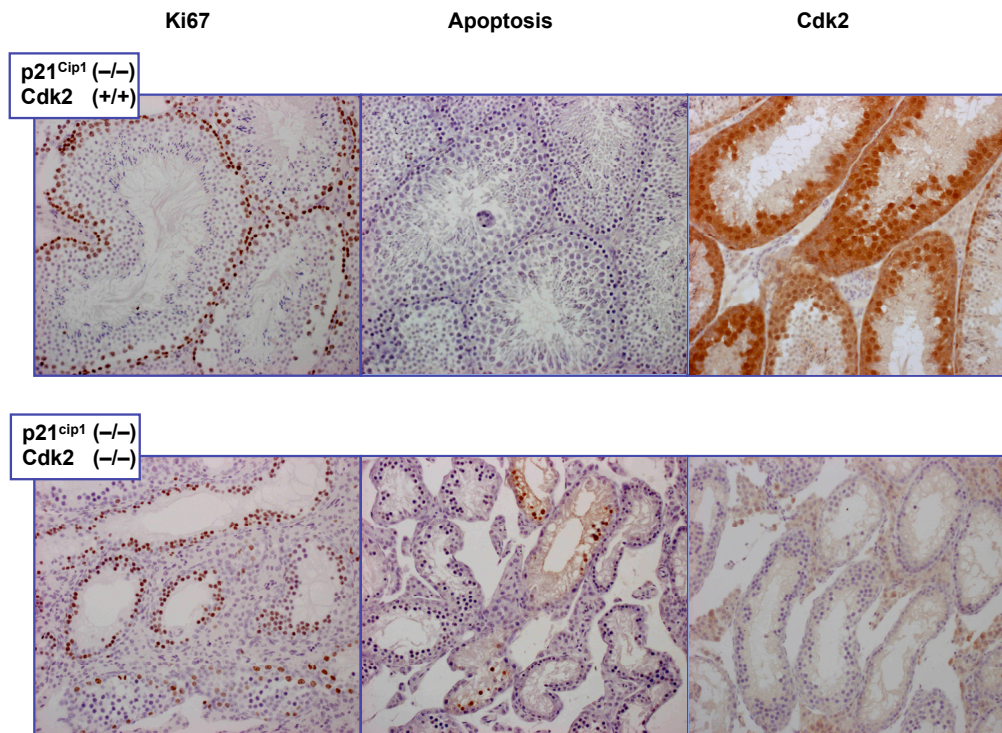


Figura 47. Defectos en la estructura de los testículos $Cdk2^{-/-};p21^{-/-}$. Idem figura 45.

Todos estos resultados señalan que la desregulación de Cdk2 no juega un papel tan relevante como se pensaba en el desarrollo tumoral causado por la eliminación de los inhibidores p21 y p27.

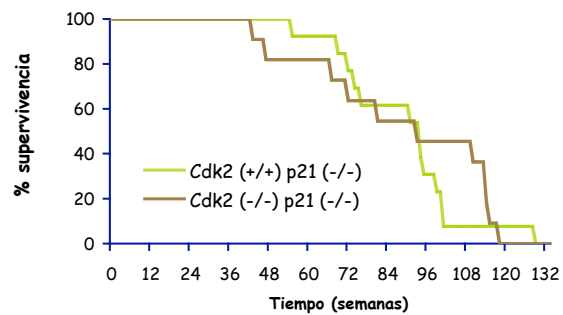
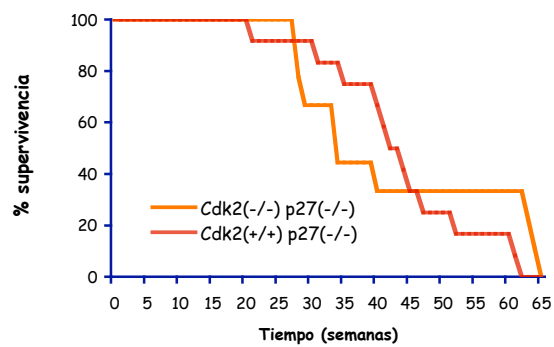


Figura 48. Evaluación del efecto en la supervivencia de la ausencia de *Cdk2* en un fondo genético carente de *p27* o *p21*.



7 DISCUSIÓN

7.1 Un nuevo planteamiento del ciclo celular

Las fluctuaciones en la actividad catalítica de los complejos heterodiméricos Cdk-ciclina determinan en última instancia, el avance y progresión del ciclo celular a lo largo de todas y cada una de sus etapas. Así, un aumento paulatino en la actividad quinasa asociada a los pares Cdk-ciclina permitiría, por este orden, la replicación del material genético y la mitosis celular, mientras que el posterior descenso de dicha actividad enzimática devolvería al sistema a su situación inicial de partida facultándolo para acometer o no un nuevo ciclo de división celular. El caso más sencillo lo encontramos en levaduras donde una única Cdk, en asociación con distintas ciclinas, dictamina el avance ordenado a lo largo del ciclo celular (Morgan, 1996). En mamíferos, sin embargo, la situación alcanza cotas de mayor complejidad. De este modo, la concepción más aceptada actualmente atribuye a las ciclinas de la familia D, asociadas a sus Cdk's respectivas, Cdk4 y Cdk6, un papel clave como conectores básicos entre la maquinaria de división celular y las señales procedentes del medio extracelular. Por otro lado las ciclinas A y E, en combinación con Cdk2, controlarían la duplicación centrosómica y la replicación del material genético, mientras que la subsiguiente activación de los complejos Cdk1-ciclina A y Cdk1-ciclina B gobernaría procesos ulteriores que culminarían con la mitosis (Sherr y Roberts, 2004).

Sin embargo, recientemente, la generación de modelos de ratón en los que la expresión de muchos de estos reguladores se ha visto comprometida a través de la creación de mutaciones deletéreas en el locus endógeno de los mencionados genes reguladores, ha dibujado un escenario nuevo, más complejo si cabe, y repleto de numerosos interrogantes objeto de abordaje en los próximos años. La investigación de la función *in vivo* de Cdk2 fue uno de los detonantes que contribuyó a replantear el esquema general del ciclo de división celular. Esta quinasa fue identificada a principios de la década de los noventa por varios grupos de investigadores a través de aproximaciones experimentales diferentes: ensayos de coimmunoprecipitación con la ciclina A, complementación de mutaciones en levaduras y por PCR mediante el uso de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de regiones altamente conservadas entre las Cdk's (Elledge et al., 1991; Paris et al 1991; Tsai et al., 1991; Ninomiya-Tsuji et al., 1991). Desde un primer momento Cdk2 fue considerada, en combinación con sus ciclinas respectivas, A y E, la quinasa central en el control de la transición G1/S (Tsai et al., 1993). A esta idea contribuyeron multitud de trabajos. Así, Cdk2 era incapaz de complementar mutaciones en Cdc2 que bloqueaban el ciclo en mitosis y en cambio, podía desbloquear sin problemas la parada en G1 provocada por mutaciones en la quinasa Cdc28 (Ninomiya-Tsuji et al., 1991). Además, la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva de Cdk2 detenía la proliferación de células en cultivo en la fase G1 del ciclo y la microinyección de anticuerpos contra Cdk2, ciclina E o ciclina A bloqueaba el inicio de la síntesis de ADN (Tsai et al., 1993; Van den Heuvel y Harlow, 1993; Hu et al., 2001; Ohtsubo et al., 1995). Por otro lado, niveles suprafisiológicos de los inhibidores Cip/Kip, cuya principal diana molecular es Cdk2, impedían la entrada del ciclo celular en la fase S (Toyoshima y Hunter, 1994; Harper et al., 1995). Más aún, en *Drosophila*, la inactivación de Cdk2 comprometía la viabilidad de la

larva o del embrión dependiendo de si su eliminación se inducía a nivel embrionario o germinal respectivamente, poniéndose de manifiesto la importancia del aporte materno de Cdk2 durante las primeras etapas del desarrollo (Lane et al., 2000). No debemos olvidar tampoco la participación de Cdk2 en la parada del ciclo en G1 inducida por la presencia de factores antiproliferativos como TGF β o de determinados agentes genotóxicos que provocan daños en el material genético (Polyak et al., 1994; Brugarolas et al., 1999). Como también se ha detallado en la introducción, la participación de Cdk2 no parece limitarse únicamente a la transición G1/S del ciclo. Así diversos trabajos le atribuyen también una función más o menos relevante en la entrada y salida de mitosis a través de mecanismos todavía poco claros (Guadagno y Newport, 1996; Hu et al., 2001; D'Angiolella et al., 2001; Mitra y Enders, 2004). Por el contrario, la función de esta quinasa durante el paso de la fase G1 a la fase S está bastante mejor caracterizada y pasa en gran medida por su capacidad de catalizar la inactivación de las proteínas de la familia del retinoblastoma (Rb), p107, p130 y Rb (Sherr, 2000). Cdk2 completaría la fosforilación de Rb iniciada por los complejos Cdk4,6-ciclina D, anulando la actividad represora de las proteínas del retinoblastoma al promover su disociación de los factores de transcripción E2F, necesarios para la expresión de genes requeridos en fases subsiguientes. Sin embargo, el hecho de que la inhibición de Cdk2 en células Rb^{-/-} provoque un impedimento proliferativo amplía el espectro de acción de esta Cdk (Lukas et al., 1995, 1996; Koh et al., 1995; Medema et al., 1995; Ohtsubo et al., 1995). A parte de Rb, se han identificado un gran número de sustratos fosforilados por Cdk2 (Malumbres y Barbacid, 2005). Algunos están implicados en la duplicación de los centrosomas (Nucleofosmina, Mps1, CP110), otros en la replicación (Cdt1, Cdc6, Mcm2 y Mcm4, RPA) y reparación del ADN (BRCA1, ku70), un tercer grupo participaría en el control de la expresión de histonas (HIRA, CBP/300, p220) y otros genes (B-Myb, E2F1) y finalmente habría también proteínas reguladoras de checkpoints (p53, p21, Mdm2). Además, los complejos Cdk2-ciclina E son capaces de fosforilar su propio inhibidor p27 y en consecuencia favorecer su degradación por la ruta del proteosoma (Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997; Elledge y Harper 1998; Bloom y Pagano 2003; Nakayama et al., 2001).

7.1.1 Cdk2 es dispensable en ciclos mitóticos normales y neoplásicos, pero esencial durante la progresión meiótica

Por todos estos motivos resultaba difícil poner en duda la esencialidad de esta quinasa en el proceso de división celular. Sin embargo algunos estudios parecían pronosticar todo lo contrario. Por ejemplo, la implantación de una actividad E2F constitutiva en fibroblastos de roedor donde la actividad Cdk2 había sido inhibida, permitía una proliferación celular sostenida (DeGregory et al., 1995). No obstante por tratarse de una actividad E2F suprafisiológica la relevancia de este hallazgo planteaba bastantes dudas.

También resultaba sorprendente la resistencia de ciertas líneas celulares al efecto antiproliferativo mediado por el inhibidor p27, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la actividad Cdk2 (Naruse et al., 2000). Todas estas evidencias empezaron a

cobrar peso a raíz del estudio realizado por Tetsu y McCormick y publicado en el año 2003 en la revista *Cancer Cell*. En él empezaban investigando la propiedad mostrada por ciertos inhibidores de la ruta de las MAP quinasas a la hora de parar el ciclo de división celular en la fase G1, cuando eran administrados al medio de cultivo en el que se encontraban creciendo ciertas líneas celulares derivadas de cáncer de colon. Como la parada en G1 correlacionaba con un descenso de las actividades Cdk2 y Cdk4, procedieron a determinar la contribución de la ausencia de cada una de ellas al bloqueo en G1. Así, la inhibición de Cdk4, por sobreexpresión de p16, tratamiento con inhibidores químicos o mediante el uso de dominantes negativos, reproducía fielmente el fenotipo citostático promovido por los inhibidores de la ruta de las MAP quinasas. Por el contrario, el silenciamiento de la actividad Cdk2, por sobreexpresión de p27 o del dominante negativo Cdk2D145N, resultaba totalmente ineficaz a la hora de bloquear la división celular. Sin embargo y al menos con el último de los procedimientos, sí se conseguía detener la proliferación de otras líneas celulares cancerosas (U2-OS, SaOs, Hela, C33A) lo que confirmaba las observaciones ya publicadas en trabajos anteriores. Por el contrario, en todas las líneas celulares analizadas, la eliminación de Cdk2 mediante el uso de ARN antisentido o ARN de interferencia, no alteraba el ritmo proliferativo de ninguna de ellas. Por tanto, ¿cómo conciliar estas aparentes discrepancias?

La respuesta, muy posiblemente, habría que buscarla en las características propias de cada una de las técnicas utilizadas en estos estudios. De este modo, el uso de dominantes negativos estaría afectando no sólo a la funcionalidad de la molécula diana, Cdk2 en este caso, sino también a la de otras moléculas (ciclinas, inhibidores....) que serían secuestradas por la forma mutada de Cdk2 que se sobreexpresa, y en consecuencia apartadas de sus sustratos. Por tanto el fenotipo observado podría no deberse tanto a la eliminación de Cdk2 como a la de algunos de sus reguladores asociados. Baste recordar tan sólo el efecto deletéreo descrito en ratones defectivos en ciclina A2 (Murphy et al., 1997). Por el contrario el uso de ARN antisentido o de interferencia, se considera una herramienta más específica y limpia, que revelaría con mayor fidelidad las funciones propias de la molécula diana.

En todo caso lo que resulta incuestionable es la normalidad proliferativa tras la inactivación de Cdk2 exhibida por las líneas celulares de cáncer de colon descritas en el artículo. Por tanto, ¿cómo explicar la proliferación de estas células en ausencia de Cdk2?

Es posible que por tratarse de células transformadas la alteración de rutas implicadas en el control del ciclo celular ponga en marcha mecanismos compensatorios. Por un lado la elevada actividad Cdk4 detectada en muchas de estas líneas de cáncer de colon habría podido convertir en redundante la actividad Cdk2. Esto explicaría el descenso en la fosforilación de Rb a nivel de residuos considerados específicos de los pares Cdk2-ciclina con la sola inhibición de Cdk4. Además, mutaciones en la ruta de p53 o la sobreexpresión de la proteína quinasa aurora A (alteraciones muy comúnmente encontradas en estas líneas celulares), contribuirían a disminuir los requerimientos de Cdk2 en procesos tales como la duplicación centrosómica.

El siguiente paso consistió en demostrar si la dispensabilidad de Cdk2 era también extensible a ciclos mitóticos normales. Aquí es donde entraría en juego este trabajo de tesis doctoral. Con la generación por “gene-targeting” de animales defectivos en Cdk2 comprobamos que la ausencia de esta quinasa no afectaba al desarrollo normal del embrión ni del individuo adulto, donde la tasa de supervivencia no difería de la observada en los controles (Ortega et al., 2003). El único defecto que se detectó fue a nivel de la gametogénesis, de modo que tanto machos como hembras presentaban gónadas atrofiadas y eran totalmente estériles. Como ya hemos visto, la falta de Cdk2 bloquea la progresión del ciclo meiótico en la profase I al activarse muy probablemente el checkpoint de paquitenio como consecuencia de fallos en el apareamiento cromosómico. En ovocitos la meiosis se veía interrumpida también en la profase I pero alcanzaba el estadio de diploteno. Aunque *a priori* inesperado, este fenotipo tenía un claro precedente en *D. Melanogaster* donde la disminución de Cdk2 reducía drásticamente el número de huevos durante la puesta (Lane et al., 2000).

Cuando se aislaron fibroblastos murinos a partir de embriones a día 13,5 p.c y se analizaron sus propiedades proliferativas, no se detectaron anomalías ni en cultivos asincrónicos ni bajo condiciones de sincronía por privación de suero. Tan sólo se observó un pequeño retraso en la cinética de entrada en fase S de células Cdk2^{-/-} próximas a la senescencia y una disminución más acelerada que en los controles de los niveles de expresión de ciertos reguladores de ciclo (ciclina A, E y Cdk1) con el número de pases. Estas dos pequeñas diferencias en el comportamiento de los MEFs Cdk2^{-/-} se explican por la entrada prematura en crisis. El hallazgo más interesante relacionado con la falta de esta quinasa, fue la ausencia de actividad ciclina E tanto en presencia de Rb como de histona H1. También la pérdida de Cdk2 se traducía en una reducción de los niveles de actividad ciclina A lo cual se atribuyó a la falta de la propia Cdk2 y a la disminución señalada anteriormente en los niveles de expresión de Cdk1 y de ciclina A.

Un trabajo paralelo realizado por el grupo de P. Kaldis (Berthet et al., 2003) basado también en la inactivación endógena de Cdk2, confirmó gran parte de las observaciones antes mencionadas, a la vez que realizó algunas aportaciones interesantes. Por ejemplo, hizo extensivo el análisis bioquímico a MEFs inmortales y a otros tipos celulares, entre ellos a esplenocitos de animales adultos, donde además de no detectarse actividad ciclina E en ausencia de Cdk2, tampoco se observó traza alguna de actividad ciclina A, que en cambio sí era detectable en MEFs primarios y en bazo de animales jóvenes. Estos resultados confirmaban la importancia de la ciclina A durante el desarrollo embrionario ampliándola también a los primeros estadios del desarrollo postnatal.

7.1.2 Buscando un sustituto para Cdk2: ¿de vuelta al modelo primigenio de levaduras?

Llegados a este punto se hace necesario encontrar una explicación al modo en que células somáticas sin Cdk2 y desprovistas de todas aquellas alteraciones que podrían estar operando en un contexto neoplásico, son capaces de proliferar con normalidad:

1.- Como primera hipótesis de trabajo podríamos considerar que Cdk2 sólo es funcionalmente activa en meiosis mientras que su presencia en células somáticas es meramente testimonial, debido a razones evolutivas aún desconocidas. Sin embargo, el hecho de que una proteína sea dispensable para la realización de un proceso dado no significa que en condiciones normales, no participe en la ejecución de dicho proceso. Así la eliminación en el ratón y otros organismos de un gran número de genes con funciones claramente definidas en el control del ciclo celular ha tenido muchas veces un impacto mínimo para la división de las células. Por otro lado, el hecho de que en un gran número de rutas de señalización celular la actividad Cdk2 sea objeto de inhibición apoya la importancia de esta quinasa en ciclos mitóticos normales. Pensemos por ejemplo en el papel central jugado por Cdk2 en los mecanismos moleculares utilizados por TGF β o diversos agentes genotóxicos para detener la proliferación celular (Polyak et al., 1994; Brugarolas et al., 1999) .

2.- Una segunda posibilidad otorgaría a Cdk2 un papel redundante en la realización de todos aquellos procesos que se consideraban bajo su control exclusivo y que podrían ser ejecutados, paralelamente, por otros complejos Cdk-ciclina. Es posible que Cdk2 hubiera surgido como Cdk meiótica orquestando de forma destacada muchos de los procesos propios de la meiosis. En el transcurso de la evolución podría haber extendido su presencia a otros compartimentos tisulares donde se sumaría al compendio de funciones ya desempeñadas por otras Cdk originariamente mitóticas. Esta hipótesis entraría en conflicto con numerosos estudios que defienden la participación central de Cdk2 en la fosforilación de un gran número de moléculas necesarias para la proliferación celular (Malumbres y Barbacid 2005). Sin embargo, no hay apenas evidencias genéticas de la importancia de estas fosforilaciones en el proceso de división celular ni tampoco, de demostrarse tal relevancia, se puede excluir la participación de otras Cdk o quinasas en dichas fosforilaciones. Bien es cierto también que la ausencia de actividad quinasa asociada a ciclina E o la pérdida de complejos activos Cdk-ciclina A detectados ante la falta de Cdk2 pondrían en entredicho esta hipótesis (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003). Otro dato revelador y que cuestionaría la validez de esta teoría, lo encontramos en células irradiadas donde, como consecuencia de la inhibición de Cdk2, la fosforilación de Rb quedaría excluida de aquellos residuos considerados Cdk2 específicos a pesar de la presencia de actividad Cdk4 (Brugarolas et al., 1999).

3.- Otra posible explicación sería la puesta en marcha de mecanismos compensadores que cubrirían el hueco dejado por Cdk2. Hasta la fecha se han identificado 11 Cdk y 9 proteínas quinasas estrechamente relacionadas con aquéllas que comparten una alta homología de secuencia. Muchas de estas Cdk son candidatas potenciales a compensar la falta de Cdk2, es decir, a desempeñar las funciones de ésta únicamente en su ausencia.

Así por ejemplo Cdk3, como Cdk2, es capaz de acomplejarse con las ciclinas A y E y de fosforilar Rb. Además, al igual que Cdk2, se cree que Cdk3 tiene funciones independientes de Rb, ya que la sobreexpresión de un dominante negativo de esta quinasa en células donde la ruta de Rb ha sido inactivada (con el antígeno T del virus SV40), conduce a un bloqueo del ciclo celular (Hofman et al., 1996). Sin embargo en todas las cepas de ratones de laboratorio se

ha identificado una mutación de terminación prematura en el gen de Cdk3 que conduce a la síntesis de una proteína inactiva por carecer al menos de 1/3 del dominio catalítico (Ye et al., 2001).

Cdk4 y Cdk6 reúnen algunos requisitos que las convierten en candidatos potenciales. De este modo en el trabajo realizado por Tetsu y McCormick (2003) se pudo comprobar la fosforilación, por parte de estas dos Cdk, de residuos en Rb hasta la fecha considerados específicos de Cdk2. Por otro lado, una de las principales funciones atribuidas a Cdk2 es su participación en el proceso de replicación del ADN. Recientemente se ha establecido una incipiente conexión entre dicho proceso y los pares Cdk4/ciclina D1, tras el hallazgo de estos heterodímeros en los complejos prereplicativos (Gladden y Diehl, 2003). No obstante se desconoce todavía su implicación funcional. También y de la misma forma que en los dobles mutantes Cdk4^{-/-}; Cdk6^{-/-} se ha observado un cierto grado de compensación por parte de Cdk2 (Malumbres et al., 2004), que incrementa su asociación con las ciclinas de la familia D y su actividad quinasa asociada, no sería descabellado pensar que algo similar sucediera en células Cdk2^{-/-} por parte de estas dos quinasas.

Sin embargo a pesar de todos estos argumentos favorables existe alguna evidencia genética que no invita al optimismo. Se han generado animales Cdk2^{-/-};Cdk6^{-/-} sin que se hayan podido detectar más alteraciones que la suma de las encontradas en cada uno de los mutantes por separado (Malumbres et al., 2004). Pero teniendo en cuenta la proximidad estructural y funcional entre Cdk4 y Cdk6 resulta difícil descartar a Cdk6 como la quinasa compensadora, ya que en su ausencia Cdk4 podría desempeñar la mayor parte de sus funciones. Una estrategia similar se está siguiendo en el caso de Cdk4, si bien la complejidad es mayor ya que la generación de animales Cdk2^{-/-};Cdk4^{-/-} es bastante improbable a través de cruces ordinarios debido a la estrecha proximidad entre los *loci* de ambos genes. Por ello en el laboratorio se ha procedido a la inactivación condicional e inducible del locus endógeno de Cdk4 en células portadoras de una alteración similar en el locus de Cdk2. Se ha comprobado que la falta de estas dos quinasas resulta totalmente prescindible para la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* durante el desarrollo embrionario y post embrionario del animal (Barriere et al., aceptado para publicación en Molecular Oncology). Por tanto hasta la generación y caracterización de animales triples mutantes Cdk2/Cdk4/Cdk6 será difícil dilucidar el tipo de relación intergénica existente entre estas quinasas.

Finalmente, en los últimos años la figura de Cdk1 ha cobrado especial interés por considerarla algunos la quinasa con mayor potencial para remplazar funcionalmente a Cdk2. De hecho, aunque la actividad Cdk1 se eleva súbitamente en los albores de la mitosis, sus niveles durante la transición G1/S son muy similares a los de Cdk2 (Bashir y Pagano, 2005). Además, mutaciones en la quinasa de *S. cerevisiae* Cdc28, cuyo homólogo más próximo en mamíferos es Cdk1, conducen a una parada del ciclo en G1 en lugar de en G2/M, donde se considera más decisivo el papel de esta Cdk. También diversos estudios realizados a comienzos de los años noventa con células de vertebrados señalaban la implicación de Cdk1 en el proceso de replicación además de su participación en mitosis (D'Urso et al., 1990;

Furukawa et al., 1990; Blow et al., 1990). Una publicación reciente del grupo de Philip Kaldis aparecida en la revista *Nature Cell biology* ha aportado datos interesantes al respecto. En este artículo se describe la asociación, hasta la fecha poco argumentada *in vivo*, entre Cdk1 y la ciclina E, así como la existencia de una actividad quinasa ciclina E de la que se presume, los complejos Cdk1-ciclina E serían los responsables, al menos en un contexto genético en el que la ausencia de Cdk2 coexista con la de p27. Bajo esta premisa sería factible pensar que los complejos Cdk1-ciclina A y Cdk1-ciclina E estarían compensando, respectivamente, la falta de los dímeros Cdk2-ciclina A y Cdk2-ciclina E siempre y cuando, en el caso de este último, p27 no estuviera presente. De estarlo, el inhibidor se asociaría al complejo Cdk1-ciclina E y haría indetectable su actividad catalítica. Sin embargo, este mecanismo aquí recogido plantea varios interrogantes. En primer lugar quedaría por demostrar que la actividad quinasa asociada a la ciclina E se deba a su interacción con Cdk1 y no a la de otros factores que en ausencia de p27 pudieran asociarse con la ciclina. Por otro lado en las células Cdk2^{-/-} donde la presencia de p27 inhibe la actividad de los complejos Cdk1-ciclina E, la función compensadora ejercida parcialmente por estos heterodímeros no existiría, a no ser que su implicación estuviera más relacionada con la presencia física del complejo que con su actividad quinasa. Más aún, MEFs Cdk2^{-/-} inmortales carecen de actividad ciclina A (Berthet et al., 2003) y crecen con normalidad, por lo que tampoco la participación de los complejos Cdk1-ciclina A parece muy determinante en el remplazamiento funcional de Cdk2. Finalmente, tampoco la actividad y expresión de Cdk1 en células Cdk2^{-/-} parecen hablar a favor del papel compensador atribuido a esta quinasa, ya que en contra de lo esperable, los niveles de ambos parámetros disminuyen.

4.- Como última explicación plausible al hecho de que células sin Cdk2 puedan dividirse con total normalidad, estaría el fenómeno de la plasticidad embrionaria. Es posible que en el embrión en desarrollo, ante la falta de esta quinasa, se hayan puesto en marcha programas genéticos de adaptación a un escenario molecular sin Cdk2 que de otro modo no se habrían producido. Sin embargo, el trabajo realizado con MEFs primarios e inmortales portadores de una mutación condicional de Cdk2, permitió eliminar de forma controlada la expresión de esta quinasa sin que se llegaran a detectar problemas de proliferación en células que hasta entonces habían contado con niveles normales de Cdk2 (Ortega et al., 2003). No obstante faltaría por analizar detalladamente las consecuencias de esta pérdida inducible de Cdk2 en el animal adulto, donde, a falta de resultados definitivos, todavía no se han detectado alteraciones dignas de mención.

Es obvio que todavía quedan muchas incógnitas por despejar para poder ofrecer una respuesta aclaratoria que ayude a elegir entre todas las opciones hasta aquí recogidas. A pesar de todos estos interrogantes es posible que, al igual que sucede en levaduras donde la presencia de una única Cdk es suficiente para dirigir sin ningún tipo de limitación la progresión del ciclo de división celular, en mamíferos ocurra algo muy similar y a través de mecanismos no muy diferentes. A esta idea parecen conducir los cada vez más numerosos modelos animales en los que la pérdida combinada de distintas Cdk o ciclinas resulta altamente tolerable para la maquinaria de división celular cuyo funcionamiento prosigue inalterable.

7.1.3 Funciones de la ciclina E independientes de Cdk2

El hallazgo en el ratón de la dispensabilidad de Cdk2 para la proliferación celular y el desarrollo tanto embrionario como postembrionario, tuvo su refrendo con la generación de animales doblemente defectivos en las dos ciclinas de la familia E (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). A pesar de que los embriones $E1^{-/-}; E2^{-/-}$ morían por problemas placentarios a día 10 p.c, muchos conseguían completar con éxito su desarrollo cuando la gestación acontecía en presencia de placentas silvestres. Además, cuando se aislaron MEFs de embriones $E1^{-/-}; E2^{-/-}$, se comprobó que su capacidad de proliferación en cultivos asincrónicos era similar a la mostrada por las células control antes de alcanzar la fase de senescencia. Estos resultados, como en el caso de Cdk2, sorprendían bastante por lo que se alejaban de las expectativas creadas a raíz de numerosos estudios precedentes. Por ejemplo, en *Drosophila* la eliminación de la ciclina E resulta crítica para la viabilidad del embrión por la importancia que tiene esta ciclina en la inactivación de la ubiquitin ligasa APC, implicada en la degradación de las ciclinas A y B necesarias durante las fases S, G2 y M del ciclo de división celular (Knoblich et al., 1994; Vodermaier et al., 2002).

A pesar del paralelismo fenotípico entre la falta de Cdk2 y ciclina E en cuanto a propiedades proliferativas se refiere, la eliminación de esta última revelaba defectos más profundos, que por no manifestarse en ausencia de Cdk2, sólo pueden explicarse atribuyendo a la ciclina E funciones independientes de Cdk2. Así se pudo comprobar la importancia de esta ciclina en tres situaciones muy particulares del ciclo celular:

1.- Ciclos endoreplicativos propios de los trofoblastos placentarios (TGC: trofoblast giants cells) y de los precursores plaquetarios. Con la pérdida de la ciclina E, el contenido poliploide de estos tipos celulares se veía gravemente comprometido alcanzando cifras más bajas de lo normal. También en la mosca de la fruta, como en el ratón, se había descrito la participación de la ciclina E en este proceso sin que todavía se haya dilucidado su mecanismo de actuación (Follete et al., 1998). Se cree que al igual que en el caso de la salida de quiescencia (ver a continuación), la participación de la ciclina E estaría estrechamente relacionada con la formación de los complejos prereplicativos (Su y O'Farrell, 1997 y 1998).

2.- Salida de quiescencia. MEFs dobles mutantes $E1^{-/-}; E2^{-/-}$ estimulados a entrar en ciclo tras haber sido mantenidos en condiciones restrictivas de suero, son incapaces de entrar en fase S, a pesar de fosforilar e inactivar eficientemente la proteína del retinoblastoma (Geng et al., 2003). Un análisis en mayor profundidad demostró que en estas células la secuencia de interacciones que conducía a la formación de los complejos prereplicativos, estaba bloqueada en el punto correspondiente al ensamblaje de las proteínas MCM. Se postula que la ciclina E abriría una ventana de oportunidad que permitiría la formación de los complejos prereplicativos y que más adelante se encargaría de cerrar la ciclina A (Coverly et al., 2002). Ésta, al promover el inicio de la replicación mediante la fosforilación de sustratos aún por identificar, y la modificación fosforilativa de Cdc6 y muy posiblemente de otros integrantes de los complejos prereplicativos, estaría impidiendo la replicación de la misma región cromatínica más de una

vez dentro del mismo ciclo. Este modelo, sin embargo, no explica cómo conseguiría la ciclina A iniciar la replicación del ADN al comienzo de la fase S, si su actividad quinasa no alcanza niveles significativos hasta bien entrada ésta. Posiblemente un segundo complejo quinasa, Cdc7p-Dbf4p, que se sabe opera en la transición G1/S del ciclo y que también ha sido vinculado al proceso de replicación, ayudaría a la ciclina A en esta labor (Bell y Dutta, 2002). Ante la falta de un fenotipo similar en células Cdk2(-/-), para la realización de esta función, la ciclina E, no requeriría de su Cdk mayoritaria o bien en su ausencia, otras Cdks podrían asumir el papel catalítico precisado por la ciclina. Además de Cdk2, Cdk1 y Cdk3 son capaces de interaccionar con la ciclina E y formar complejos activos al menos bajo determinadas circunstancias. Excluida Cdk3 por la razón ya mencionada, Cdk1 se convierte en la Cdk candidata con más posibilidades. No obstante no podemos descartar tampoco como explicación alternativa que la sola presencia de la ciclina E catalíticamente inactiva bastara para ejecutar con eficacia esta función. Un trabajo reciente realizado en el laboratorio del Dr. Sicinski, (Geng et al., 2007) apuntaría en esta dirección. Así, mediante el uso de un mutante de ciclina E capaz de unirse a Cdk2 pero sin actividad quinasa asociada, se observó una asociación parcial de las proteínas MCM a los complejos prereplicativos de células E1^{-/-};E2^{-/-} que de este modo, aunque en número algo inferior, eran capaces de entrar en fase S. Finalmente el hecho de que la ciclina E no sea necesaria para la formación de los complejos prereplicativos cuando las células avanzan hacia la fase S desde mitosis y sí cuando lo hacen desde un estado de quiescencia, añade aún más interrogantes al papel de esta ciclina en este proceso

3.- Transformación celular. Cuando se analizó la susceptibilidad de MEFs E1^{-/-};E2^{-/-} a la transformación inducida por distintas combinaciones oncogénicas (Ras y E1A, Ras y un dominante negativo de p53, Ras y Myc) se observó una acusada reducción en el número de focos tanto en relación a las células control como a las que carecían de Cdk2 (Geng et al., 2003; Ortega et al., 2003). Por tanto, la actividad oncogénica de la ciclina E tampoco parece depender de la presencia de su Cdk mayoritaria. En la literatura existía algún precedente al respecto (Geisen y Mörröy, 2002). Estudios previos realizados en REFs (fibroblastos embrionarios de rata) donde el oncogén H-ras era coexpresado con distintas formas mutantes de ciclina E, revelaron la existencia de transformación celular incluso cuando la asociación entre la ciclina E y Cdk2 era abolida. El hecho de que estos mutantes incapaces de interaccionar y activar Cdk2, fallaran también a la hora de acelerar la transición G1/S del ciclo pero fueran capaces de inducir transformación celular, ponía de manifiesto la existencia de otras funciones de la ciclina E que estarían contribuyendo en parte a su actividad oncogénica. De este modo se ha demostrado la participación de esta ciclina en el control de la duplicación centrosómica, en la salida de mitosis así como en la mediación de una proliferación celular sostenida en ausencia de actividad E2F (Lukas et al., 1997; Matsumoto et al., 1999; Hinchcliffe et al., 1999; D'Angiolella et al., 2001). Como ya hemos mencionado es posible que su interacción con otras Cdks, como Cdk1, sirva para remplazar la ausencia de Cdk2 o que esta ciclina posea una actividad independiente de Cdk aún por identificar. Actualmente en el

laboratorio se están generando modelos tumorales de ratón con los que se pretende analizar *in vivo*, el papel oncogénico de la ciclina E en ausencia de Cdk2. Para ello, en distintos tejidos de interés (mama y timo principalmente) se ha combinado la sobreexpresión de ciclina E, en un fondo genético Cdk2^{+/+} o Cdk2^{-/-}, con la falta ubicua de p27, por tratarse de dos marcadores asociados a un alto valor pronóstico en algunos cáncer humanos.

7.1.4 Importancia de Cdk2 como diana antineoplásica

Son muchos los esfuerzos que llevan invertidos las compañías farmacéuticas en el diseño de fármacos antitumorales dirigidos hacia la inhibición de una actividad Cdk, en general, y Cdk2 en particular, exacerbada en un gran número de cánceres humanos. Algunos de estos inhibidores (Flavopiridol, UCN-01, CYC-202 y BMS-387032) están actualmente bajo evaluación clínica y aunque su uso individual no ha dado muestras todavía de eficacia terapéutica, su combinación con otros fármacos, muchos de ellos de uso ordinario en quimioterapia, sí invita a un cierto optimismo (Fischer et al., 2004). Sin embargo, los resultados presentados hasta el momento y que confirman la ausencia de defectos proliferativos tanto en células sanas como tumorales desprovistas de Cdk2, lanza un mensaje de prudencia que es conveniente tener presente. Es posible que el espectro de acción de los inhibidores químicos de las Cdk que hasta ahora se han mostrado más eficaces, no sea todo lo específico que se piensa y esté afectando a otras moléculas cuya alteración sea la verdadera causa de la eficacia atribuida a estos fármacos. Conviene aclarar que la mayoría de estos inhibidores, al funcionar como análogos estructurales del ATP y debido a la similitud conformacional de los dominios catalíticos de las Cdk, no actúan de forma selectiva sobre una quinasa en concreto. Además en aquellos casos en los que se ha trabajado con paneles quinasa a gran escala, se ha podido comprobar que el alcance del efecto inhibitorio mostrado por muchos de estos inhibidores de Cdk se ampliaba a otras quinasas estrechamente relacionadas con ellas como ERK 1/2 y GSK3 β (Fischer et al., 2004).

También es cierto, que la eliminación de una proteína no es comparable a la inhibición de su actividad biológica. En éste último caso la presencia funcionalmente silenciada de la proteína estaría afectando a la actividad de todas aquellas moléculas que interaccionan con ella y que se verían apartadas de sus sustratos y por tanto, privadas del cumplimiento de sus funciones. Este mismo principio sería aplicable a la hora de explicar las divergencias ya descritas entre el uso de dominantes negativos o microinyección de anticuerpos, y el empleo de métodos más sofisticados por su especificidad como son los ARN de interferencia o la propia técnica de silenciamiento génico por gene targeting. La generación por esta última aproximación experimental de animales en los que se anule la función pero no la expresión de genes implicados en el control del ciclo celular, como las Cdk, será una herramienta más útil y próxima a la realidad terapéutica que permitirá conocer mejor la implicación de estos reguladores en los procesos neoplásicos.

7.1.5 Los inhibidores Cip/Kip: algo más que reguladores de la actividad Cdk2.

Como ya hemos señalado, uno de los principales mecanismos que controlan la actividad quinasa de los complejos Cdk-ciclina y por tanto la progresión ordenada a lo largo del ciclo, son las interacciones con moléculas inhibitoras (Morgan, 1996). De las dos familias descritas hasta la fecha, INK4 y Cip/Kip, la última de ellas, integrada por los inhibidores p21, p27 y p57, es la de mayor espectro por ser capaz de modular la actividad catalítica asociada a las 4 Cdk con un papel más relevante en el ciclo celular: Cdk1, Cdk2, Cdk4 y Cdk6. Si bien el efecto de los inhibidores Cip/Kip sobre los complejos Cdk4,6-ciclina D sigue siendo objeto de controversia, nadie cuestiona su capacidad inhibitoria sobre los dímeros Cdk2-ciclina. Son muchos los trabajos donde se correlaciona el descenso crítico de complejos activos Cdk2-ciclina y el cese proliferativo propiciado por los inhibidores Cip/Kip (Tetsu y McCormick, 2003). De este modo, evidencias *in vivo* las encontramos en la parada que sufren las células en G1 ante un daño en su material genético o debido a la presencia del agente antiproliferativo TGF β (Polyak et al., 1994; Brugarolas et al., 1999). En ambos casos la puesta en marcha de mecanismos moleculares dirigidos a provocar una inducción de los niveles de expresión de p21 y p27 respectivamente, conducen a la inhibición de la actividad Cdk2 y al bloqueo de la transición G1-S del ciclo (Toyoshima y Hunter, 1994; Harper et al., 1995). Del mismo modo, la sobreexpresión de estos inhibidores provoca en un gran número de tipos celulares el descenso de la actividad Cdk2 y el fin de la proliferación celular (Toyoshima y Hunter, 1994; Harper et al., 1995; Tetsu y McCormick, 2003). Por el contrario la expresión ectópica de ciertos mutantes Cip/Kip defectivos en su interacción con los complejos Cdk2-ciclina y por tanto en la inhibición de su actividad quinasa, resultó ser mucho más ineficiente a la hora de reproducir el fenotipo citostático observado en el caso de la sobreexpresión de las formas silvestres (Kwon et al., 1998; Lin et al., 1996).

Otras aproximaciones experimentales basadas en la generación de animales defectivos en alguno/s de estos inhibidores confirmaron su papel como reguladores negativos del ciclo celular. Así por ejemplo, en ratones p27^{-/-} se observó un fenotipo hiperplásico que afectaba a una amplia gama de tejidos, entre ellos el timo. Los linfocitos de estos animales además de tener índices proliferativos claramente superiores a los de las células control, presentaban un incremento considerable en la actividad quinasa asociada a Cdk2 (Fero et al., 1996). Por su parte en MEFs p21^{-/-} se detectó una entrada prematura en la fase S del ciclo, posiblemente debido al acortamiento de la fase G1 que la precede, a la vez que se registró un aumento de hasta cuatro veces en los niveles de actividad Cdk2 (Brugarolas et al., 1998; Martin et al., 2005). Más aún, la pérdida simultánea de ambos inhibidores potenciaba significativamente el aumento de la actividad catalítica de esta quinasa (Cheng et al., 1999).

Todos estos resultados consolidan el modelo inhibitorio de la actividad Cdk2 como la explicación más sólida de la función de los inhibidores Cip/Kip.

Nos propusimos investigar la validez de este modelo abordando su estudio desde un punto de vista tanto genético como bioquímico. Cuando repetimos los experimentos de

sobreexpresión con p21 y p27 en células $Cdk2^{-/-}$ y por tanto en ausencia de su principal diana molecular, el ciclo celular seguía deteniéndose de la misma forma que en las células control. Tampoco observamos cambios en la respuesta antiproliferativa provocada por la sobreexpresión de un mutante de p21 incapaz de interactuar con el factor de procesividad de la ADN polimerasa δ , PCNA, de modo que las células dejaban de dividirse con una eficiencia similar a la observada en el caso de la forma silvestre y con independencia del contexto genético. Sin embargo, la expresión ectópica tanto en células $Cdk2^{+/+}$ como $Cdk2^{-/-}$, de un mutante de p27 en el que se había eliminado su capacidad de interacción con los complejos Cdk-ciclina, resultó fallida a la hora de bloquear la proliferación celular. Asumiendo que este mutante conserve intactas el resto de sus funciones, podemos afirmar que, al menos en ausencia de Cdk2, la actividad inhibitoria de p27 y muy posiblemente la de p21 y p57, se llevaría a cabo a través de su asociación con otros complejos Cdk-ciclina.

La existencia de una mutación deletérea en el locus endógeno de Cdk3 minimizaría la importancia de esta quinasa en el mecanismo utilizado por los inhibidores Cip/Kip. Tampoco las posibilidades de Cdk4 y Cdk6 parecen muy altas. Por un lado, la sobreexpresión de p21 y p27 en condiciones que promueven la inhibición de Cdk2 y el bloqueo del ciclo celular, mantiene intacta la actividad de estas dos quinasas. Por otro, niveles suprafisiológicos de ambos inhibidores en MEFs $Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$ o en sus equivalentes $D1^{-/-};D2^{-/-};D3^{-/-}$ conducen también a una parada del ciclo celular (Malumbres et al., 2004; Kozar et al., 2004). Si la causa de este bloqueo se debe a la compensación que podría estar ejerciendo Cdk2 sólo lo sabremos con la generación de animales triples $Cdk2^{-/-};Cdk4^{-/-};Cdk6^{-/-}$ o cuádruples mutantes $D1^{-/-};D2^{-/-};D3^{-/-};Cdk2^{-/-}$. Por el contrario, cada vez son más los que apoyan la participación de Cdk1 en este proceso. De la misma forma que se defiende el remplazamiento funcional de Cdk2 por Cdk1 resulta lógico pensar que, al menos en un escenario sin Cdk2, Cdk1 pase a soportar los mismos mecanismos de control que operan sobre los complejos Cdk2-ciclina, entre ellos la inhibición ejercida por las moléculas Cip/Kip. De hecho en la literatura ya existía constancia de que Cdk1 pudiera interactuar con estos inhibidores y que como resultado de dicha interacción su actividad quinasa disminuyera (Toyoshima y Hunter, 1994, Harper et al., 1995). También nosotros pudimos confirmar esta observación en nuestro estudio.

Diversos trabajos de reciente publicación han contribuido a dar relevancia y difusión a este hipotético mecanismo. Uno de los comienzos fue la generación y caracterización de animales defectivos en la proteína Skp2 (Nakayama et al., 2000), una de las muchas proteínas F-box utilizadas por la ubiquitín ligasa SCF para la degradación proteolítica de un gran número de reguladores de ciclo. A través de su interacción con la forma fosforilada en el residuo Thr187 de p27, SCF^{Skp2} cataliza la ubiquitinación del inhibidor que será posteriormente degradado por la ruta del proteosoma durante la transición G1-S. El fenotipo más destacado de los animales $Skp2^{-/-}$ fue la presencia, en un amplio espectro de compartimentos tisulares (principalmente riñón, pulmón e hígado), de células poliploides con un elevado número de centrosomas, lo que

parece sugerir un fallo en el mecanismo responsable del bloqueo de la endoreplicación. Tras realizarse un análisis bioquímico exhaustivo, de entre los numerosos sustratos potenciales de Skp2, tan sólo p27 y la ciclina E exhibían niveles anormalmente altos en células Skp2^{-/-}. Aprovechando la existencia de animales p27^{-/-} se procedió a analizar la contribución de este inhibidor al fenotipo observado en ausencia de Skp2. Se generaron animales doblemente defectivos en Skp2 y p27 y se vio que carecían de prácticamente todos los defectos propios de los mutantes sencillos Skp2 (Nakayama et al., 2004). Este hallazgo confirmaba que la acumulación de p27 era la principal causa de la poliploidía y presencia supernumeraria de centrosomas en las células Skp2^{-/-}. Cuando se investigó el mecanismo molecular responsable, se encontró que el exceso de p27 propiciado por la pérdida de Skp2 inhibía la actividad quinasa asociada a Cdk1 y en consecuencia bloqueaba la entrada del ciclo celular en mitosis. En ausencia de p27 el freno proliferativo desaparecía, la actividad Cdk1 recuperaba sus niveles normales y las células completaban con normalidad su ciclo de división. Este modelo, aunque demuestra la importancia de una correcta degradación temporal de p27, no ofrece ninguna evidencia genética de la conexión entre Cdk1 y p27 ni tampoco sirve para demostrar la implicación de p27 en la regulación de Cdk1 durante la transición G1/S que es cuando esta quinasa remplazaría a Cdk2. De hecho, en un contexto sin Skp2, la inhibición de Cdk1 por p27 no bloquea la entrada del ciclo en la fase S debido a la presencia de un mayor número de complejos activos Cdk2-ciclina E. Por esta razón los autores del artículo consideran que Cdk2 es la principal diana de p27 en la transición G1/S, mientras que Cdk1 lo sería en los albores de la fase M.

Finalmente la generación y caracterización de animales Cdk2^{-/-};p21^{-/-} y Cdk2^{-/-};p27^{-/-} hacía necesario atribuir a la actividad desregulada de otra Cdk la explicación de la ventaja proliferativa que seguían presentando estos dobles mutantes. Así, el ritmo proliferativo de los MEFs Cdk2^{-/-};p21^{-/-} y Cdk2^{-/-};p27^{-/-} era igual de acelerado que el de los mutantes sencillos sin p27 o p21, mientras que el fenotipo de los ratones defectivos en Cdk2 y p27 continuaba caracterizándose por la hiperplasia tisular de amplio espectro, el aumento del tamaño corporal y la alta predisposición al desarrollo de tumores de pituitaria, características todas ellas propias de animales p27^{-/-}. Esta relación epistática de tipo recesivo entre la falta de p27 y Cdk2, únicamente fallida en los órganos reproductores, ha encontrado una explicación en el estudio realizado por Allem et al. (2005) con el descubrimiento, tanto en timocitos como en esplenocitos de animales Cdk2^{-/-};p27^{-/-}, de una inesperada actividad quinasa ciclina E que parece proceder de la interacción de esta ciclina con Cdk1, tal y como revelan diversos ensayos de coinmunoprecipitación realizados. No obstante, una prueba que ayudaría a conocer de forma más detallada la relación entre Cdk1 y p27 y que aportaría validez genética al hallazgo, deberíamos buscarla en la obtención de mutantes Cdk1^{-/-};p27^{-/-} o incluso Cdk1^{-/-};Cdk2^{-/-};p27^{-/-}. Sin embargo debido al fenotipo de letalidad embrionaria tan temprana que acompaña a la inactivación germinal de Cdk1 (Malumbres y Barbacid, 2005), los esfuerzos actualmente se centran en el establecimiento de un modelo condicional que permita eliminar de

forma controlada la expresión de la proteína tanto temporal como espacialmente. Tampoco debemos olvidar la necesidad de profundizar en la relevancia que otras proteínas que se han encontrado asociadas con p27, p21 y p57 pudieran tener para la actividad inhibitoria de estos reguladores de ciclo (Coqueret, 2003; Denicourt y Dowdy, 2004). Aunque el trabajo presentado con el mutante de p27 parece atribuir una importancia capital a la interacción entre p27 y los complejos Cdk-ciclina, no se puede excluir la participación de muchas otras proteínas capaces de interaccionar con p27 y cuya asociación con la forma mutada del inhibidor no ha llegado a examinarse.

8 CONCLUSIONES

1. Cdk2 es dispensable para la proliferación de células somáticas normales. Así, la ausencia de esta quinasa no comporta ningún tipo de alteración durante el desarrollo embrionario y postnatal del ratón, cuya tasa de supervivencia es muy similar a la de sus hermanos control de camada. Del mismo modo, estudios *in vitro* realizados con MEFs Cdk2^{-/-}, demuestran que las propiedades proliferativas y bioquímicas de estas células no difieren significativamente de las observadas en los MEFs silvestres. Únicamente la falta de actividad quinasa ciclina E, el retraso en la cinética de entrada en fase S y la disminución más acelerada con el número de pases de los niveles de expresión de Cdk1, ciclina E y A caracterizan de forma singular a las células deficientes en Cdk2. Confirmando estos resultados, el análisis del proceso de regeneración hepática tras la extirpación quirúrgica del 70% del hígado, no revela perturbaciones importantes en un contexto sin Cdk2 salvo el ligero retraso en el inicio de la síntesis de ADN también detectado con las células en cultivo.
2. La implicación de Cdk2 en la regulación de la transición G1/S a través de su participación en la inactivación de la ruta del retinoblastoma y en el control de procesos tan vitales para la célula como la replicación del ADN y la duplicación de los centrosomas, no resulta tan crítico como se pensaba. De hecho, en MEFs Cdk2^{-/-}, tanto el status de los centromas y del contenido genético como el patrón de fosforilación de Rb, sobre todo en aquellos residuos específicamente fosforilados por Cdk2, no experimentan cambios destacables con respecto a los de las células control. El remplazamiento funcional de Cdk2 por otras Cdk, y más concretamente por Cdk1 es, la explicación que goza de mayor apoyo en la actualidad para justificar la dispensabilidad de Cdk2. Así, Cdk1 es capaz de interaccionar con ciclina E y de formar complejos activos en un contexto genético específico definido por la ausencia conjunta de Cdk2 y p27.
3. Cdk2 es también prescindible en ciclos mitóticos de células neoplásicas. De este modo la susceptibilidad a la transformación celular inducida por la combinación oncogénica HRas/E1A, en un fondo genético con o sin Cdk2, es muy similar. Igualmente, el uso de modelos tumorales de ratón y la realización de ensayos de carcinogénesis en piel con DMBA/TPA, ponen de manifiesto que, con independencia del status de Cdk2, el espectro, latencia e incidencia tumoral así como la supervivencia del animal no sufren cambios reseñables. Estos datos lanzan una llamada de atención sobre la conveniencia de utilizar inhibidores específicos de la actividad Cdk2 en la terapia antitumoral.
4. El checkpoint responsable de la parada del ciclo en la fase G1 y activado en respuesta a numerosos agentes genotóxicos, es funcional en ausencia de Cdk2. Por tanto, muy

- posiblemente otros complejos Cdk-ciclina así como otros sustratos tipo PCNA, serán objetivo, al menos en ausencia de Cdk2, del efecto inhibitorio inducido por la sobreexpresión fisiológica de p21
5. Cdk2 es esencial en el proceso de diferenciación de las células reproductoras al gobernar la progresión celular a lo largo de la profase I de la meiosis. La pérdida de Cdk2 induce una esterilidad severa tanto en machos como en hembras cuyas gónadas están atrofiadas y presentan graves alteraciones histológicas. Aunque el mecanismo molecular se desconoce todavía con exactitud, la activación del checkpoint de paquitenio, al menos en el caso de los espermatoцитos $Cdk2^{-/-}$, provoca una respuesta apoptótica masiva e impide la culminación del proceso de gametogénesis.
 6. La correlación parcial observada entre los fenotipos de los mutantes $Cdk2^{-/-}$ y $E1^{-/-}$; $E2^{-/-}$, ha permitido descubrir diversas funciones de la ciclina E independientes de Cdk2 en tres escenarios moleculares muy concretos: endoreplicación, transformación y salida de quiescencia.
 7. El efecto inhibitorio de los supresores tumorales Cip/Kip es independiente de Cdk2, al menos en su ausencia, pero dependiente de la actividad Cdk-ciclina. La sobreexpresión de p21 y p27 en MEFs $Cdk2^{-/-}$ sigue bloqueando la proliferación celular con la misma eficiencia que en las células $Cdk2^{+/+}$. Sin embargo, la expresión ectópica de un mutante de p27 incapaz de interaccionar con los complejos Cdk-ciclina carece de esta propiedad citostática.
 8. La pérdida conjunta de Cdk2 con cualquiera de los dos inhibidores Cip/Kip, p21 y p27, sigue preservando, tanto *in vivo* como *in vitro*, la ventaja proliferativa observada en el caso de los mutantes sencillos $p21^{-/-}$ y $p27^{-/-}$. De este modo, la hiperplasia tisular de amplio espectro y el desarrollo de tumores de pituitaria, características propias de los ratones $p27^{-/-}$, se presentan con una penetrancia idéntica en los mutantes dobles $Cdk2^{-/-}; p27^{-/-}$. El hecho de que Cdk1 sea también diana de la actividad inhibitoria Cip/Kip y el reciente hallazgo, en ausencia de Cdk2 y p27, de una, *a priori* inesperada actividad ciclina E convierten a esta quinasa en la responsable potencial del fenotipo hiperplásico de los mutantes $Cdk2^{-/-}; p27^{-/-}$.

9 BIBLIOGRAFÍA

Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara E. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 1995 Jul;86(7):617-21.

Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol.* 1997 Jul;17(7):3850-7.

Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts.

Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):831-6. Epub 2005 Jul 10.

Alevizopoulos K, Vlach J, Hennecke S, Amati B. Cyclin E and c-Myc promote cell proliferation in the presence of p16INK4a and of hypophosphorylated retinoblastoma family proteins. *EMBO J.* 1997 Sep 1;16(17):5322-33.

Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 2000 Dec 15;14(24):3102-14.

Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.* 1999 Mar 1;18(5):1223-34.

Bagui TK, Mohapatra S, Haura E, Pledger WJ. P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Mol Cell Biol.* 2003 Oct;23(20):7285-90.

Ball KL, Lain S, Fahraeus R, Smythe C, Lane DP. Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1. *Curr Biol.* 1997 Jan 1;7(1):71-80.

Balmano K, Cook SJ. Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene.* 1999 May 20;18(20):3085-97.

Bashir T, Pagano M. Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):779-81.

Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:333-74. Epub 2001 Nov 9. Review.

Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol.* 2003 Oct 14;13(20):1775-85.

Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation.
Genes Dev. 2004 Apr 15;18(8):862-76. Epub 2004 Apr 12.

Blain SW, Montalvo E, Massague J.
Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4.
J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):25863-72.

Bloom J, Pagano M.
Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation.
Semin Cancer Biol. 2003 Feb;13(1):41-7. Review.

Blow JJ, Nurse P.
A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts.
Cell. 1990 Sep 7;62(5):855-62.

Booher R, Beach D.
Site-specific mutagenesis of *cdc2+*, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
Mol Cell Biol. 1986 Oct;6(10):3523-30.

Booher RN, Holman PS, Fattaey A.
Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity.
J Biol Chem. 1997 Aug 29;272(35):22300-6.

Booher RN, Alfa CE, Hyams JS, Beach DH.
The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization.
Cell. 1989 Aug 11;58(3):485-97.

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.
Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.
Nature. 1998 Feb 5;391(6667):597-601.

Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Garman EF, Wakatsuki S, Mitchell E, Rasmussen B, Hunt T, Johnson LN.
The crystal structure of cyclin A.
Structure. 1995 Nov 15;3(11):1235-47.

Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM.
Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX.
Mol Cell Biol. 2001 May;21(10):3534-46.

Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA.
Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 2;96(3):1002-7.

Brugarolas J, Bronson RT, Jacks T.
p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells.
J Cell Biol. 1998 Apr 20;141(2):503-14.

- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ.
Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency.
Nature. 1995 Oct 12;377(6549):552-7.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.
Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.
Cell. 1999 Mar 19;96(6):857-68.
- Calhoun ES, Jones JB, Ashfaq R, Adsay V, Baker SJ, Valentine V, Hempen PM, Hilgers W, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE.
BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets.
Am J Pathol. 2003 Oct;163(4):1255-60.
- Cassia R, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Hardisson D, Cigudosa JC, Palacios J.
Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma.
J Pathol. 2003 Dec;201(4):589-95.
- Chamovitz DA, Segal D.
JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation.
EMBO Rep. 2001 Feb;2(2):96-101. Review.
- Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A.
Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1.
Mol Cell Biol. 1996 Sep;16(9):4673-82.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ.
The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts.
EMBO J. 1999 Mar 15;18(6):1571-83.
- Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY.
Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1.
Science. 1996 May 3;272(5262):719-22.
- Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM.
Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation.
Genes Dev. 1996 Aug 15;10(16):1979-90.
- Coats S, Whyte P, Fero ML, Lacy S, Chung G, Randel E, Firpo E, Roberts JM.
A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells.
Curr Biol. 1999 Feb 25;9(4):163-73.
- Coqueret O.
New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?
Trends Cell Biol. 2003 Feb;13(2):65-70. Review.
- Coqueret O, Gascan H.
Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1.
J Biol Chem. 2000 Jun 23;275(25):18794-800.

- Coverley D, Laman H, Laskey RA.
Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation.
Nat Cell Biol. 2002 Jul;4(7):523-8.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.
Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.
Nature. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.
- Cross FR.
DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol. 1988 Nov;8(11):4675-84.
- D'Angiolella V, Costanzo V, Gottesman ME, Avvedimento EV, Gautier J, Grieco D.
Role for cyclin-dependent kinase 2 in mitosis exit.
Curr Biol. 2001 Aug 7;11(15):1221-6.
- D'Urso G, Marraccino RL, Marshak DR, Roberts JM.
Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34cdc2 protein kinase.
Science. 1990 Nov 9;250(4982):786-91.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY.
DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis.
Oncogene. 1999 Dec 20;18(55):7883-99. Review.
- De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH.
Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.
Nature. 1993 Jun 17;363(6430):595-602.
- DeGregori J, Leone G, Ohtani K, Miron A, Nevins JR.
E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity.
Genes Dev. 1995 Dec 1;9(23):2873-87.
- DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR.
Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes.
Mol Cell Biol. 1995 Aug;15(8):4215-24.
- Delavaine L, La Thangue NB.
Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1.
Oncogene. 1999 Sep 23;18(39):5381-92.
- Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P.
Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control.
Cell. 1995 Aug 25;82(4):675-84.
- Denicourt C, Dowdy SF.
Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors.
Genes Dev. 2004 Apr 15;18(8):851-5.
- Desai D, Wessling HC, Fisher RP, Morgan DO.
Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2.
Mol Cell Biol. 1995 Jan;15(1):345-50.

Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP.
Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse.
Nat Genet. 2001 Feb;27(2):222-4.

Diehl JA, Sherr CJ.
A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of
cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating
kinase.
Mol Cell Biol. 1997 Dec;17(12):7362-74.

Diffley JF.
Regulation of early events in chromosome replication.
Curr Biol. 2004 Sep 21;14(18):R778-86. Review.

Dirks PB, Patel K, Hubbard SL, Ackerley C, Hamel PA, Rutka JT.
Retinoic acid and the cyclin dependent kinase inhibitors synergistically alter
proliferation and morphology of U343 astrocytoma cells.
Oncogene. 1997 Oct 23;15(17):2037-48.

Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D.
Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for
proteolytic inactivation of MPF.
Cell. 1989 Mar 10;56(5):829-38.

Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D.
Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of
fission yeast encoded by cdc2+ and suc1+.
Cell. 1987 Jul 17;50(2):319-25.

Drapkin R, Le Roy G, Cho H, Akoulitchiev S, Reinberg D.
Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct
complexes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 25;93(13):6488-93.

Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ,
Reed SI.
p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human
fibroblasts during radiation-induced G1 arrest.
Cell. 1994 Mar 25;76(6):1013-23.

Dulic V, Lees E, Reed SI.
Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase.
Science. 1992 Sep 25;257(5078):1958-61.

Duronio RJ, Bonnette PC, O'Farrell PH.
Mutations of the Drosophila dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles
for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition.
Mol Cell Biol. 1998 Jan;18(1):141-51.

Dynlacht BD, Flores O, Lees JA, Harlow E.
Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes.
Genes Dev. 1994 Aug 1;8(15):1772-86.

Dyson N.
The regulation of E2F by pRB-family proteins.
Genes Dev. 1998 Aug 1;12(15):2245-62. Review.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B.
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.
Cell. 1993 Nov 19;75(4):817-25.

Elledge SJ, Harper JW.
The role of protein stability in the cell cycle and cancer.
Biochim Biophys Acta. 1998 Apr 17;1377(2):M61-70.

Elledge SJ, Spottswood MR.
A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a cdc28 mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1.
EMBO J. 1991 Sep;10(9):2653-9.

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM.
Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins.
Cell. 1993 May 7;73(3):487-97.

Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ.
The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression.
Nature. 1998 Nov 12;396(6707):177-80.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM.
A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice.
Cell. 1996 May 31;85(5):733-44.

Fischer PM.
The use of CDK inhibitors in oncology: a pharmaceutical perspective.
Cell Cycle. 2004 Jun;3(6):742-6. Epub 2004 Jun 26. Review.

Fisk HA, Winey M.
The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication.
Cell. 2001 Jul 13;106(1):95-104.

Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J.
Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 30;91(18):8655-9.

Follette PJ, Duronio RJ, O'Farrell PH.
Fluctuations in cyclin E levels are required for multiple rounds of endocycle S phase in *Drosophila*.
Curr Biol. 1998 Feb 12;8(4):235-8.

Fotedar R, Fitzgerald P, Rousselle T, Cannella D, Doree M, Messier H, Fotedar A.
p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity.
Oncogene. 1996 May 16;12(10):2155-64.

Furstenenthal L, Kaiser BK, Swanson C, Jackson PK.
Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication.
J Cell Biol. 2001 Mar 19;152(6):1267-78.

- Furukawa Y, Piwnica-Worms H, Ernst TJ, Kanakura Y, Griffin JD.
cdc2 gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes.
Science. 1990 Nov 9;250(4982):805-8.
- Geisen C, Karsunky H, Yucel R, Moroy T.
Loss of p27(Kip1) cooperates with cyclin E in T-cell lymphomagenesis.
Oncogene. 2003 Mar 20;22(11):1724-9.
- Geisen C, Moroy T.
The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein.
J Biol Chem. 2002 Oct 18;277(42):39909-18. Epub 2002 Jul 30.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P.
Cyclin E ablation in the mouse.
Cell. 2003 Aug 22;114(4):431-43.
- Geng Y, Whoriskey W, Park MY, Bronson RT, Medema RH, Li T, Weinberg RA, Sicinski P.
Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E.
Cell. 1999 Jun 11;97(6):767-77.
- Geng Y, Lee YM, Welcker M, Swanger J, Zagozdzon A, Winer JD, Roberts JM, Kaldis P, Clurman BE, Sicinski P.
Kinase-independent function of cyclin E.
Mol Cell. 2007 Jan 12;25(1):127-39.
- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA.
Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein.
Oncogene. 1996 Mar 21;12(6):1173-80.
- Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ.
Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts.
Cell. 1991 Dec 20;67(6):1169-79.
- Gladden AB, Diehl JA.
The cyclin D1-dependent kinase associates with the pre-replication complex and modulates RB.MCM7 binding.
J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):9754-60. Epub 2003 Jan 7.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W.
Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24;98(9):5043-8. Epub 2001 Apr 17.
- Guadagno TM, Newport JW.
Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity.
Cell. 1996 Jan 12;84(1):73-82.
- Guo Y, Stacey DW, Hitomi M.
Post-transcriptional regulation of cyclin D1 expression during G2 phase.
Oncogene. 2002 Oct 24;21(49):7545-56.
- Hamaguchi JR, Tobey RA, Pines J, Crissman HA, Hunter T, Bradbury EM.
Requirement for p34cdc2 kinase is restricted to mitosis in the mammalian cdc2 mutant FT210.
J Cell Biol. 1992 Jun;117(5):1041-53.

- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T.
The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.
Science. 1988 Jul 1;241(4861):42-52. Review.
- Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S, Nakayama K.
Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway.
J Biol Chem. 2001 Dec 28;276(52):48937-43.
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC.
Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1.
Cell. 1999 Sep 17;98(6):859-69.
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ.
The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more.
Genes Dev. 2002 Sep 1;16(17):2179-206. Review.
- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al.
Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.
Mol Biol Cell. 1995 Apr;6(4):387-400.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ.
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.
Cell. 1993 Nov 19;75(4):805-16.
- Hartwell LH, Weinert TA.
Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.
Science. 1989 Nov 3;246(4930):629-34. Review.
- Hartwell LH.
Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
J Bacteriol. 1973 Sep;115(3):966-74.
- He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR, Kuang J.
Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities.
Oncogene. 2005 Apr 21;24(18):2929-43.
- Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G.
Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts.
Science. 1999 Feb 5;283(5403):851-4.
- Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G.
Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis.
EMBO J. 1993 Jan;12(1):53-63.
- Hofmann F, Livingston DM.
Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit.
Genes Dev. 1996 Apr 1;10(7):851-61.

- Hsu JY, Reimann JD, Sorensen CS, Lukas J, Jackson PK.
E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1).
Nat Cell Biol. 2002 May;4(5):358-66.
- Hu B, Mitra J, van den Heuvel S, Enders GH.
S and G2 phase roles for Cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells.
Mol Cell Biol. 2001 Apr;21(8):2755-66.
- Hua XH, Yan H, Newport J.
A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle.
J Cell Biol. 1997 Apr 7;137(1):183-92.
- Hwang HC, Clurman BE.
Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles.
Oncogene. 2005 Apr 18;24(17):2776-86. Review.
- Izumi T, Walker DH, Maller JL.
Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity.
Mol Biol Cell. 1992 Aug;3(8):927-39.
- Jackson PK, Chevalier S, Philippe M, Kirschner MW.
Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21CIP1.
J Cell Biol. 1995 Aug;130(4):755-69.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP.
Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.
Nature. 1995 Jul 27;376(6538):313-20.
- Jones SM, Kazlauskas A.
Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression.
FEBS Lett. 2001 Feb 16;490(3):110-6. Review.
- Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ.
Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4.
Genes Dev. 1993 Mar;7(3):331-42.
- Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI.
Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase.
Nat Cell Biol. 2004 Dec;6(12):1229-35.
- Kawamura K, Izumi H, Ma Z, Ikeda R, Moriyama M, Tanaka T, Nojima T, Levin LS, Fujikawa-Yamamoto K, Suzuki K, Fukasawa K.
Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression.
Cancer Res. 2004 Jul 15;64(14):4800-9.
- Kerkhoff E, Rapp UR.
Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1.
Mol Cell Biol. 1997 May;17(5):2576-86.

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Nov 14;347(20):1566-75.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res*. 1994 Jan 15;54(2):380-5.

Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Feb 1;90(3):1112-6.

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1652-9. Review.

Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene*. 1995 Jan 19;10(2):229-36.

Kitaura H, Shinshi M, Uchikoshi Y, Ono T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem*. 2000 Apr 7;275(14):10477-83.

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*. 1996 May 31;85(5):721-32.

Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):107-20.

Kobayashi H, Stewart E, Poon R, Adamczewski JP, Gannon J, Hunt T. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell*. 1992 Nov;3(11):1279-94.

Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*. 2001 Oct 5;294(5540):173-7. Epub 2001 Aug 30.

Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. 1992 Sep 18;257(5077):1689-94.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*. 1995 Jun 8;375(6531):506-10.

Kotani S, Endo T, Kitagawa M, Higashi H, Onaya T.
A variant form of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) in a malignantly transformed rat thyroid (FRTL-Tc) cell line.
Oncogene. 1995 Feb 16;10(4):663-9.

Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P.
Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins.
Cell. 2004 Aug 20;118(4):477-91.

Krude T.
Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state.
J Biol Chem. 2000 May 5;275(18):13699-707.

Krude T, Jackman M, Pines J, Laskey RA.
Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system.
Cell. 1997 Jan 10;88(1):109-19.

Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, Takata T.
High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas.
Cancer Res. 2001 Oct 1;61(19):7044-7.

Kumagai A, Dunphy WG.
Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts.
Science. 1996 Sep 6;273(5280):1377-80.

Kumagai A, Dunphy WG.
Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts.
Cell. 1992 Jul 10;70(1):139-51.

Kwon TK, Nordin AA.
Identification of cdk2 binding sites on the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor.
Oncogene. 1998 Feb 12;16(6):755-62.

Kwon TK, Buchholz MA, Jun DY, Kim YH, Nordin AA.
The differential catalytic activity of alternatively spliced cdk2 alpha and cdk2 beta in the G1/S transition and early S phase.
Exp Cell Res. 1998 Jan 10;238(1):128-35.

Kwon TK, Nordin AA.
Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase inhibitor (p27Kip1): effect on cell cycle regulation in HeLa cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1997 Sep 18;238(2):534-8.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E.
New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors.
Genes Dev. 1997 Apr 1;11(7):847-62.

Lacey KR, Jackson PK, Stearns T.
Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 16;96(6):2817-22.

Lane DP.
Cancer. p53, guardian of the genome.
Nature. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

- Lane ME, Elend M, Heidmann D, Herr A, Marzodko S, Herzig A, Lehner CF. A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics*. 2000 May;155(1):233-44.
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2515-20. Epub 2001 Feb 20.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*. 1996 Aug 23;271(34):20608-16.
- Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*. 1987 May 7-13;327(6117):31-5.
- Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*. 1995 Mar 15;9(6):639-49.
- Lee MP, DeBaun M, Randhawa G, Reichard BA, Elledge SJ, Feinberg AP. Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet*. 1997 Aug;61(2):304-9.
- Lees EM, Harlow E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of *cdc2* kinase. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb;13(2):1194-201.
- Li J, Meyer AN, Donoghue DJ. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):502-7.
- Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y. Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2001 Sep;32(9):945-53.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*. 2002 Oct;8(10):1153-60. Epub 2002 Sep 16.
- Lin J, Reichner C, Wu X, Levine AJ. Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1786-93.
- Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnicka-Worms H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol*. 1997 Feb;17(2):571-83.

- Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW.
p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers.
Am J Pathol. 1999 Feb;154(2):313-23. Review.
- Lukas J, Herzinger T, Hansen K, Moroni MC, Resnitzky D, Helin K, Reed SI, Bartek J.
Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway.
Genes Dev. 1997 Jun 1;11(11):1479-92.
- Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K.
Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression.
Mol Cell Biol. 1996 Mar;16(3):1047-57.
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J.
Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16.
Nature. 1995 Jun 8;375(6531):503-6.
- Luo RX, Postigo AA, Dean DC.
Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription.
Cell. 1998 Feb 20;92(4):463-73.
- Ma T, Van Tine BA, Wei Y, Garrett MD, Nelson D, Adams PD, Wang J, Qin J, Chow LT, Harper JW.
Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription.
Genes Dev. 2000 Sep 15;14(18):2298-313.
- Mahony D, Parry DA, Lees E.
Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells.
Oncogene. 1998 Feb 5;16(5):603-11.
- Malumbres M, Barbacid M.
Mammalian cyclin-dependent kinases.
Trends Biochem Sci. 2005 Nov;30(11):630-41. Epub 2005 Oct 19.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M.
Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6.
Cell. 2004 Aug 20;118(4):493-504.
- Malumbres M, Carnero A.
Cell cycle deregulation: a common motif in cancer.
Prog Cell Cycle Res. 2003;5:5-18. Review.
- Malumbres M, Barbacid M.
To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.
Nat Rev Cancer. 2001 Dec;1(3):222-31. Review.
- Marone M, Scambia G, Giannitelli C, Ferrandina G, Masciullo V, Bellacosa A, Benedetti-Panici P, Mancuso S.
Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression.
Int J Cancer. 1998 Jan 5;75(1):34-9.

- Martin A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell*. 2005 Jun;7(6):591-8.
- Matsumoto Y, Hayashi K, Nishida E. Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol*. 1999 Apr 22;9(8):429-32.
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 1995 Mar 15;9(6):650-62.
- Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1994 Mar;14(3):2066-76.
- Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991 May 17;65(4):701-13.
- McConnell BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassembly of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1981-9.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):782-7.
- Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 3;92(14):6289-93.
- Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J, Nigg EA. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol*. 1999 Jun;1(2):88-93.
- Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J*. 1992 Aug;11(8):2909-17.
- Mihara M, Shintani S, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT. Overexpression of CDK2 is a prognostic indicator of oral cancer progression. *Jpn J Cancer Res*. 2001 Mar;92(3):352-60.
- Minella AC, Swanger J, Bryant E, Welcker M, Hwang H, Clurman BE. p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr Biol*. 2002 Oct 29;12(21):1817-27.

- Mitra J, Enders GH.
Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells.
Oncogene. 2004 Apr 22;23(19):3361-7.
- Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK.
Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines.
Nature. 2001 Sep 20;413(6853):311-6.
- Moreno S, Hayles J, Nurse P.
Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis.
Cell. 1989 Jul 28;58(2):361-72.
- Morgan DO.
Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.
Annu Rev Cell Dev Biol. 1997;13:261-91. Review.
- Morgan DO.
The dynamics of cyclin dependent kinase structure.
Curr Opin Cell Biol. 1996 Dec;8(6):767-72. Review.
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG.
Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase.
Mol Biol Cell. 1995 Jan;6(1):119-34.
- Muraoka RS, Lenferink AE, Law B, Hamilton E, Brantley DM, Roebuck LR, Arteaga CL.
ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells.
Mol Cell Biol. 2002 Apr;22(7):2204-19.
- Murphy M, Stinnakre MG, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M, Carrington M, Brechot C, Sobczak-Thépot J.
Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene.
Nat Genet. 1997 Jan;15(1):83-6.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI.
Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis.
Dev Cell. 2004 May;6(5):661-72.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S.
Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication.
EMBO J. 2000 May 2;19(9):2069-81.
- Nakayama K, Nakayama K.
Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development.
Bioessays. 1998 Dec;20(12):1020-9. Review.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K.
Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors.
Cell. 1996 May 31;85(5):707-20.

- Nakayama KI, Hatakeyama S, Nakayama K.
Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1.
Biochem Biophys Res Commun. 2001 Apr 13;282(4):853-60. Review.
- Naruse I, Hoshino H, Dobashi K, Minato K, Saito R, Mori M.
Over-expression of p27kip1 induces growth arrest and apoptosis mediated by changes of pRb expression in lung cancer cell lines.
Int J Cancer. 2000 Nov 1;88(3):377-83.
- Nelsen CJ, Hansen LK, Rickheim DG, Chen C, Stanley MW, Krek W, Albrecht JH.
Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2.
Oncogene. 2001 Apr 5;20(15):1825-31.
- Nigg EA.
Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control?
Curr Opin Cell Biol. 1996 Jun;8(3):312-7. Review.
- Ninomiya-Tsuji J, Nomoto S, Yasuda H, Reed SI, Matsumoto K.
Cloning of a human cDNA encoding a CDC2-related kinase by complementation of a budding yeast cdc28 mutation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 15;88(20):9006-10.
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR.
Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen.
Exp Cell Res. 1994 Mar;211(1):90-8.
- Noguchi E, Sekiguchi T, Yamashita K, Nishimoto T.
Molecular cloning and identification of two types of hamster cyclin-dependent kinases: cdk2 and cdk2L.
Biochem Biophys Res Commun. 1993 Dec 30;197(3):1524-9.
- Norbury C, Nurse P.
Animal cell cycles and their control.
Annu Rev Biochem. 1992;61:441-70. Review.
- Nurse P, Bissett Y.
Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast.
Nature. 1981 Aug 6;292(5823):558-60.
- Nurse P.
Genetic control of cell size at cell division in yeast.
Nature. 1975 Aug 14;256(5518):547-51.
- Ohi R, Gould KL.
Regulating the onset of mitosis.
Curr Opin Cell Biol. 1999 Apr;11(2):267-73. Review.
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M.
Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition.
Mol Cell Biol. 1995 May;15(5):2612-24.

Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K.
Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication.
Cell. 2000 Sep 29;103(1):127-40.

Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M.
Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice.
Nat Genet. 2003 Sep;35(1):25-31. Epub 2003 Aug 17.

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G.
Cyclin A is required at two points in the human cell cycle.
EMBO J. 1992 Mar;11(3):961-71.

Pardee AB.
G1 events and regulation of cell proliferation.
Science. 1989 Nov 3;246(4930):603-8. Review.

Paris J, Le Guellec R, Couturier A, Le Guellec K, Omilli F, Camonis J, MacNeill S, Philippe M.
Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA coding for a protein highly homologous to *cdc2*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Feb 1;88(3):1039-43.

Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z, Amati B.
Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells.
EMBO J. 2003 Sep 15;22(18):4794-803.

Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E.
Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors.
Mol Cell Biol. 1999 Mar;19(3):1775-83.

Pavletich NP.
Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors.
J Mol Biol. 1999 Apr 16;287(5):821-8. Review.

Peeper DS, Upton TM, Ladha MH, Neuman E, Zalvide J, Bernards R, DeCaprio JA, Ewen ME.
Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein.
Nature. 1997 Mar 13;386(6621):177-81. Erratum in: *Nature* 1997 Apr 3;386(6624):521.

Petersen BO, Lukas J, Sorensen CS, Bartek J, Helin K.
Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization.
EMBO J. 1999 Jan 15;18(2):396-410.

Piggott JR, Rai R, Carter BL.
A bifunctional gene product involved in two phases of the yeast cell cycle.
Nature. 1982 Jul 22;298(5872):391-3.

Pines J, Hunter T.
Cyclins A and B1 in the human cell cycle.
Ciba Found Symp. 1992;170:187-96; discussion 196-204. Review.

- Pines J, Hunter T.
Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B.
Nature. 1990 Aug 23;346(6286):760-3.
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J.
Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.
Cell. 1994 Jul 15;78(1):59-66.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A.
p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.
Genes Dev. 1994 Jan;8(1):9-22.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM.
Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients.
Nat Med. 1997 Feb;3(2):222-5.
- Qi Z, Huang QQ, Lee KY, Lew J, Wang JH.
Reconstitution of neuronal Cdc2-like kinase from bacteria-expressed Cdk5 and an active fragment of the brain-specific activator. Kinase activation in the absence of Cdk5 phosphorylation.
J Biol Chem. 1995 May 5;270(18):10847-54.
- Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.
Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability.
Nature. 2004 Mar 4;428(6978):77-81.
- Reed SI, Wittenberg C.
Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(15):5697-701.
- Reed SI.
The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division.
Genetics. 1980 Jul;95(3):561-77.
- Reimann JD, Freed E, Hsu JY, Kramer ER, Peters JM, Jackson PK.
Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex.
Cell. 2001 Jun 1;105(5):645-55.
- Riabowol K, Draetta G, Brizuela L, Vandre D, Beach D.
The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells.
Cell. 1989 May 5;57(3):393-401.
- Russell P, Nurse P.
Schizosaccharomyces pombe and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided.
Cell. 1986 Jun 20;45(6):781-2. Review.

- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP.
Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex.
Nature. 1996 Jul 25;382(6589):325-31.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE.
Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1.
Genes Dev. 1997 Jun 1;11(11):1464-78.
- Sherr CJ, Roberts JM.
Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.
Genes Dev. 2004 Nov 15;18(22):2699-711. Review.
- Sherr CJ.
The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited.
Cancer Res. 2000 Jul 15;60(14):3689-95. Review.
- Sherr CJ, Roberts JM.
CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.
Genes Dev. 1999 Jun 15;13(12):1501-12. Review.
- Sherr CJ.
Cancer cell cycles.
Science. 1996 Dec 6;274(5293):1672-7. Review.
- Sherr CJ, Roberts JM.
Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.
Genes Dev. 1995 May 15;9(10):1149-63. Review.
- Sherr CJ.
G1 phase progression: cycling on cue.
Cell. 1994 Nov 18;79(4):551-5. Review.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL.
PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization.
Nat Med. 2002 Oct;8(10):1145-52. Epub 2002 Sep 16.
- Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM.
Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells.
Genes Dev. 1999 Sep 15;13(18):2375-87.
- Snowden AW, Anderson LA, Webster GA, Perkins ND.
A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation.
Mol Cell Biol. 2000 Apr;20(8):2676-86.
- Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J, Koff A.
Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle.
Cell Growth Differ. 1996 Feb;7(2):135-46.
- Soucek T, Pusch O, Hengstschlager-Ottner E, Adams PD, Hengstschlager M.
Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A- and E-associated kinase activities independently from cell cycle position.
Oncogene. 1997 May 15;14(19):2251-7.

- Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CG.
Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer.
Oncogene. 2003 Jul 31;22(31):4898-904.
- Spruck CH, Strohmaier H, Sangfelt O, Muller HM, Hubalek M, Muller-Holzner E, Marth C, Widschwendter M, Reed SI.
hCDC4 gene mutations in endometrial cancer.
Cancer Res. 2002 Aug 15;62(16):4535-9.
- Spruck CH, Won KA, Reed SI.
Deregulated cyclin E induces chromosome instability.
Nature. 1999 Sep 16;401(6750):297-300.
- Stearns T.
Centrosome duplication. a centriolar pas de deux.
Cell. 2001 May 18;105(4):417-20. Review..
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI.
Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line.
Nature. 2001 Sep 20;413(6853):316-22.
- Su TT, O'Farrell PH.
Chromosome association of minichromosome maintenance proteins in Drosophila endoreplication cycles.
J Cell Biol. 1998 Feb 9;140(3):451-60.
- Su TT, O'Farrell PH.
Chromosome association of minichromosome maintenance proteins in Drosophila mitotic cycles.
J Cell Biol. 1997 Oct 6;139(1):13-21.
PMID: 9314525 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Sugimoto M, Martin N, Wilks DP, Tamai K, Huot TJ, Pantoja C, Okumura K, Serrano M, Hara E.
Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1).
Oncogene. 2002 Nov 21;21(53):8067-74.
- Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M.
Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP.
Oncogene. 1998 Aug 27;17(8):931-9.
- Tanaka H, Yamashita T, Asada M, Mizutani S, Yoshikawa H, Tohyama M.
Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity.
J Cell Biol. 2002 Jul 22;158(2):321-9. Epub 2002 Jul 15.
- Tetsu O, McCormick F.
Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition.
Cancer Cell. 2003 Mar;3(3):233-45.
- Th'ng JP, Wright PS, Hamaguchi J, Lee MG, Norbury CJ, Nurse P, Bradbury EM.
The FT210 cell line is a mouse G2 phase mutant with a temperature-sensitive CDC2 gene product.
Cell. 1990 Oct 19;63(2):313-24.

- Todaro GJ, Wolman SR, Green H.
Rapid transformation of human fibroblasts with low growth potential into established cell lines by SV40.
J Cell Physiol. 1963 Dec;62:257-65.
- Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K.
Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication.
J Biol Chem. 2001 Jun 15;276(24):21529-37. Epub 2001 Feb 27.
- Toyoshima H, Hunter T.
p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21.
Cell. 1994 Jul 15;78(1):67-74.
- Tsai LH, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K.
The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells.
Oncogene. 1993 Jun;8(6):1593-602.
- Tsai LH, Harlow E, Meyerson M.
Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase.
Nature. 1991 Sep 12;353(6340):174-7.
- van den Heuvel S, Harlow E.
Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control.
Science. 1993 Dec 24;262(5142):2050-4.
- Vlach J, Hennecke S, Amati B.
Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.
EMBO J. 1997 Sep 1;16(17):5334-44.
- Vodermaier HC, Peters JM.
Conspiracy to disarm APC in interphase.
Nat Cell Biol. 2002 May;4(5):E119-20.
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.
The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.
Nature. 1994 Jun 16;369(6481):574-8.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D.
p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.
Nature. 1993 Dec 16;366(6456):701-4.
- Xu Y, Baltimore D.
Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control.
Genes Dev. 1996 Oct 1;10(19):2401-10.
- Yan Y, Frisen J, Lee MH, Massague J, Barbacid M.
Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development.
Genes Dev. 1997 Apr 15;11(8):973-83.
- Yang HY, Shao R, Hung MC, Lee MH.
p27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis.
Oncogene. 2001 Jun 21;20(28):3695-702.

- Ye X, Zhu C, Harper JW.
A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 13;98(4):1682-6. Epub 2001 Feb 6.
- Zarkowska T, Mitnacht S.
Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases.
J Biol Chem. 1997 May 9;272(19):12738-46.
- Zeng YX, Somasundaram K, el-Deiry WS.
AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression.
Nat Genet. 1997 Jan;15(1):78-82.
- Zhang H, Hannon GJ, Beach D.
p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states.
Genes Dev. 1994 Aug 1;8(15):1750-8.
- Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC.
Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF.
Cell. 2000 Mar 31;101(1):79-89.
- Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ.
Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome.
Nature. 1997 May 8;387(6629):151-8.
- Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, Fletcher JA, Harlow E.
NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription.
Genes Dev. 2000 Sep 15;14(18):2283-97.
- Zou L, Stillman B.
Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase.
Mol Cell Biol. 2000 May;20(9):3086-96.

10 ANEXO

Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice

Sagrario Ortega¹, Ignacio Prieto², Junko Odajima¹, Alberto Martín¹, Pierre Dubus³, Rocio Sotillo¹, Jose Luis Barbero², Marcos Malumbres¹ & Mariano Barbacid¹

We targeted the locus encoding the cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) by homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells. Embryonic fibroblasts lacking CDK2 proliferate normally and become immortal after continuous passage in culture. Elimination of a conditional *Cdk2* allele in immortal cells does not have a significant effect on proliferation. *Cdk2*^{-/-} mice are viable and survive for up to two years, indicating that CDK2 is also dispensable for proliferation and survival of most cell types. But CDK2 is essential for completion of prophase I during meiotic cell division in male and female germ cells, an unforeseen role for this cell cycle kinase.

CDK2 (refs. 1,2) is thought to be essential in the mammalian cell cycle by driving cells through the G1/S transition (in association with E-type cyclins) and allowing them to progress through the S phase (in association with A-type cyclins). Whereas A-cyclins (A1 and A2) can also associate with the mitotic CDK1 kinase, CDK2 is the only known catalytic partner for E-cyclins (E1 and E2; ref. 3). The precise identity of the physiologically relevant substrates for CDK2 is controversial. Yet, it is well established that CDK2–cyclin E complexes are responsible for completing the inactivation of retinoblastoma (Rb), a step thought to be necessary for initiation of DNA synthesis⁴. Other proposed targets of CDK2–cyclin E include the transcription factor E2F-5 (ref. 5); CDC6, a preinitiation factor essential for generating functional DNA replication origins⁶; p220NPAT, a protein involved in S phase-specific histone gene transcription^{7,8}; nucleophosmin (NPM/B23) and MPS1, two proteins presumably involved in centrosome duplication^{9,10}; and its own inhibitor, p27 (also called Kip1), which is then targeted for degradation^{11,12}. Loading of CDC45 onto replication origins, a prerequisite for recruitment of DNA polymerase to DNA initiation complexes, also seems to depend on CDK2–cyclin E activity¹³. It is therefore believed that initiation of DNA replication requires a peak of CDK2 activity accomplished by accumulation of cyclin E levels and concomitant disappearance of p27.

Once S phase has started, cyclin E is autophosphorylated by the CDK2–cyclin E complex. Phosphorylated cyclin E is recognized by the F-box protein FBW7 (also called hCDC4 and AGO) and targeted for destruction by the SCF proteasome¹⁴. Degradation of cyclin E allows CDK2 to bind to its second partner, A-type cyclins. CDK2–cyclin A phosphorylates CDC6 inducing its translocation from the nucleus to the cytoplasm, an event that has been implicated in preventing reinitiation

of DNA replication during the S and G2 phases of the cell cycle¹⁵. CDK2–cyclin A also phosphorylates CDH1, one of the ubiquitin ligase components of the anaphase-promoting complex (APC) required for degradation of cyclin B1. Phosphorylation of CDH1 induces its release from the APC, leading to an increase in cyclin B1 levels required for progression through the G2/M transition¹⁶. CDK2–cyclin A complexes have also been proposed to have a key role in centrosome duplication¹⁷.

These observations strongly suggest that CDK2 must be essential for cell proliferation. Moreover, early studies have shown that dominant-negative mutants of CDK2, antibodies against CDK2, cyclin E or cyclin A, and *Cdk2* antisense RNA block DNA synthesis or cell proliferation^{18–22}. These observations have been recently challenged²³, however, by the finding that certain cancer cells proliferate despite CDK2 inhibition. To better understand the function of CDK2 in cell proliferation, not only in cultured cells but also in such complex organisms as mice, we targeted the *Cdk2* locus by homologous recombination in ES cells. Here, we report that ablation of *Cdk2* in the germ line of mice does not have substantial consequences for embryonic or postnatal development, except in germ cells. Analysis of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) indicates that CDK2 is dispensable for cell cycle progression and proliferation but has an unanticipated role in meiotic cell division.

RESULTS

Generation of mice lacking CDK2

To target the mouse *Cdk2* locus, we knocked-in two loxP sites flanking coding exons 2 and 3 of *Cdk2* by homologous recombination in ES cells (Fig. 1). Removal of these sequences by a Cre recombinase eliminates the PSTAIRE cyclin-binding domain. Moreover, splicing from

¹Molecular Oncology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Melchor Fernández Almagro 3, Madrid E-28029, Spain. ²Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, UAM Campus de Cantoblanco, Madrid E-28029, Spain. ³E.A. 2406, Histologie et Pathologie Moléculaire, Université de Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France. Correspondence should be addressed to S.O. (sortega@cniio.es) or M.B. (barbacid@cniio.es).

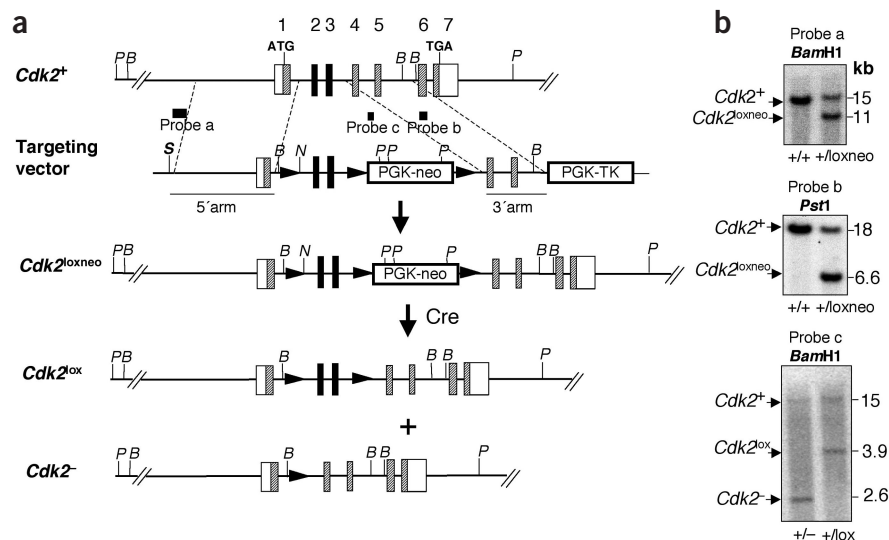


Figure 1 Gene-targeting strategy. (a) Schematic representation of *Cdk2* alleles used in this study. The mouse *Cdk2* locus contains seven exons (boxes) spanning 8 kb. Noncoding sequences (open boxes), nontargeted coding sequences (hatched boxes), targeted exons (filled boxes), loxP sites (filled triangles) and translational initiator (ATG) and terminator (TGA) codons are indicated. The PGK-*neo*^r cassette and the PGK-TK cassette used for selection of homologous recombinant ES clones are indicated by open boxes. Cre, bacteriophage Cre recombinase. Wild-type and mutated *Cdk2* alleles are indicated. (b) Southern-blot analysis of recombinant ES cell clones carrying the indicated alleles. The origin of the probes is indicated in a. Sizes of the diagnostic DNA fragments are indicated.

exon 1 to exon 4 sequences causes a frameshift in the open reading frame that results in the synthesis of a putative polypeptide of 81 amino acid residues, of which the last 42 are unrelated to CDK2. To select for recombinant ES cells, we inserted a phosphoglycerate kinase promoter (PGK)-neomycin resistance gene (*neo*^r) cassette flanked by loxP sites between exons 3 and 4 (Fig. 1). We used ES cells carrying this targeted allele, *Cdk2*^{loxneo}, to generate *Cdk2*^{+/loxneo} heterozygous mice and removed the loxP-flanked sequences by crossing *Cdk2*^{+/loxneo} mice

with CMV-*cre* transgenic mice²⁴ (Fig. 1). Heterozygous *Cdk2*^{+/−} mice are normal and fertile. Homozygous *Cdk2*^{−/−} mice are born from heterozygous parents at the expected mendelian ratio. We confirmed the absence of CDK2 expression in *Cdk2*^{−/−} mice by western-blot analysis of various tissues (data not shown). Mice lacking CDK2 had no gross anatomical or behavioral abnormalities for up to two years, except for severe atrophy in their gonads (both testes and ovaries), resulting in complete sterility.

Cdk2^{−/−} MEFs

Primary MEFs isolated from midgestation *Cdk2*^{−/−} embryos had no detectable CDK2 expression (Fig. 2a). Immunoprecipates obtained with antibodies to CDK2 did not phosphorylate histone H1 and Rb, two of the best-known substrates of CDK2 (Fig. 2b). Similarly, immunoprecipates obtained with antibodies to cyclin E did not phosphorylate these substrates above background levels (Fig. 2b). In contrast, immunoprecipates obtained with antibodies to cyclin A had substantial H1 kinase activity (Fig. 2b), presumably due to the association of cyclin A with CDK1. Rb was phosphorylated in *Cdk2*^{−/−} cells. Western-blot analysis with antisera specific for certain CDK-phosphorylated residues showed efficient phosphorylation of Ser795, a substrate of CDK4-cyclin D, and Thr821, a residue thought to be specifically phosphorylated by CDK2-cyclin E²⁵ (Fig. 2c).

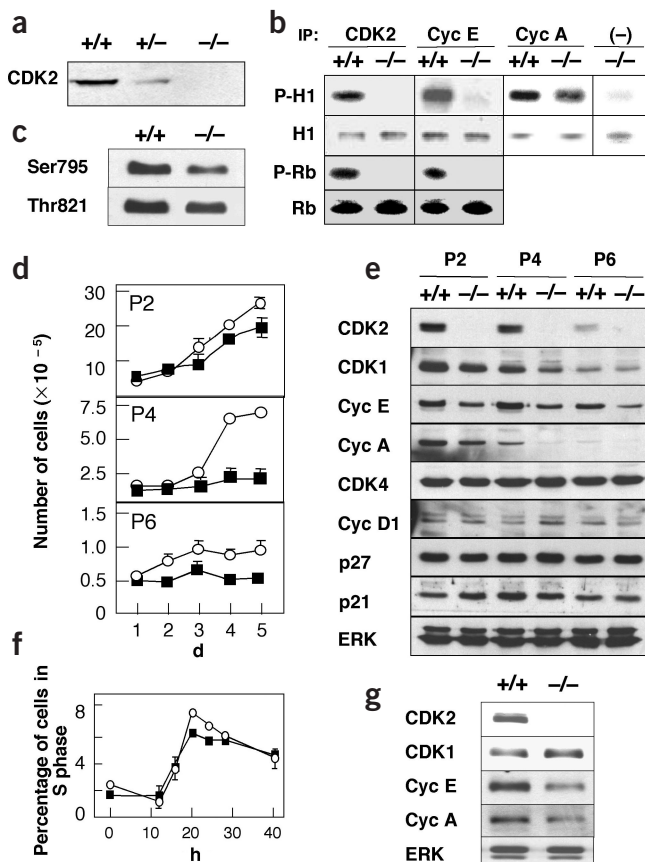
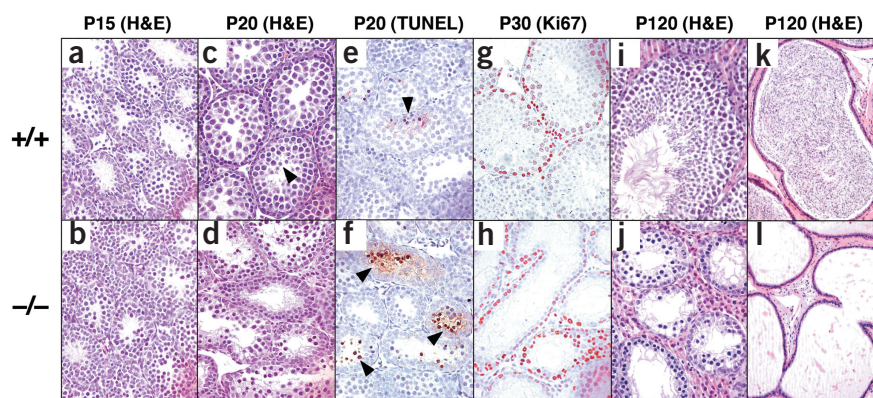


Figure 2 Properties of *Cdk2*^{−/−} MEFs. (a) Western-blot analysis of *Cdk2*^{+/+}, *Cdk2*^{+/−} and *Cdk2*^{−/−} MEFs with antibodies to CDK2. (b) *In vitro* CDK2-, cyclin E- and cyclin A-associated kinase activity in extracts of *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{−/−} MEFs immunoprecipitated (IP) with antibodies against CDK2, cyclin E and cyclin A using histone H1 and Rb as substrates. A negative control without antibodies (−) is also included. (c) Phosphorylation of Rb residues Ser795 and Thr821 in extracts derived from *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{−/−} MEFs using antibodies specific for phosphorylated Ser795-Rb and Thr821-Rb phosphopeptides. (d) Growth curves of primary (P2, P4 and P6) *Cdk2*^{+/+} (open circles) and *Cdk2*^{−/−} (filled squares) MEFs. (e) Western-blot analysis of *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{−/−} primary (P2, P4 and P6) MEFs with antibodies directed against the indicated cell cycle proteins. An antibody against ERK1/2 was used for loading control. (f) S-phase kinetics after restimulation of serum-starved P2 MEFs. (g) Western-blot analysis of *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{−/−} immortalized MEFs (P20) with antibodies directed against the indicated cell cycle proteins. An antibody against ERK1/2 was used for loading control.

Figure 3 Defective spermatogenesis in *Cdk2*^{-/-} males. Testes derived from *Cdk2*^{+/+} (a,c,e,g,i,k) and *Cdk2*^{-/-} mice (b,d,f,h,j,l). (a–d) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of P15 (a,b) and P20 (c,d) testes. Arrowheads in c indicate round spermatids. (e,f) TUNEL staining of P20 testes. Arrowheads indicate tubules in which primary spermatocytes are undergoing apoptosis. (g,h) Ki67 immunostaining in tubules of P30 testes. (i,j) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of testes sections from P120 mice. (k,l) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of epididymis from P120 mice.



Thr821 in *Cdk2*^{-/-} cells is probably phosphorylated by CDK4, a kinase that can phosphorylate Rb, even at sites previously defined as CDK2-specific, when the activity of CDK2 is abolished²³.

Primary passage 2 (P2) *Cdk2*^{-/-} MEFs grew well in culture and proliferated with kinetics similar to those of MEFs derived from heterozygous (data not shown) and wild-type embryos (Fig. 2d). At P4, however, *Cdk2*^{-/-} MEFs had slightly lower proliferation rates, suggesting that they might enter culture crisis earlier than wild-type MEFs. Levels of cyclin E and CDK1 were lower in P4 *Cdk2*^{-/-} MEFs and expression of cyclin A was almost undetectable (Fig. 2e). By P6, normal and mutant MEFs proliferated poorly, indicating that they had entered crisis (Fig. 2d), and expression of CDK1 and cyclin A was much lower (Fig. 2e). The level of cyclin E was constant in wild-type MEFs but decreased in *Cdk2*^{-/-} MEFs, probably owing to the absence of CDK2 (Fig. 2e). The expression levels of CDK4, cyclin D1, p27 and p21 (also called Cip1) were similar in *Cdk2*^{-/-} and *Cdk2*^{+/+} MEFs at all passages (Fig. 2e).

Serum-starved P2 *Cdk2*^{-/-} MEFs entered S phase with the same kinetics as their wild-type counterparts after serum stimulation (Fig. 2f). P4 *Cdk2*^{-/-} MEFs also entered S phase, but with delayed kinetics (4 h). We observed a parallel delay in the rate of Rb phosphorylation in residues Ser795 and Thr821 in P4 *Cdk2* mutant cells (data not shown). Primary *Cdk2*^{-/-} MEFs formed colonies when plated as single cells, albeit 40% less efficiently than wild-type MEFs. Primary *Cdk2*^{-/-} MEFs could be transformed either by transfection with *Ras* and adenoviral *E1A* oncogenes or by genotoxic insult induced by etoposide, an inhibitor of DNA topoisomerase II, but mutant MEFs were transformed about 30% less efficiently than the corresponding wild-type MEFs. We observed no significant differences in the percentage of cells that underwent G1 arrest (27 ± 11% in wild-type versus 31 ± 7% in *Cdk2*^{-/-} MEFs) and G2 arrest (62 ± 12% in *Cdk2*^{+/+}

versus 56 ± 4% in *Cdk2*^{-/-} MEFs) 24 h after etoposide treatment. In addition, these cells underwent apoptosis with similar rates, 28% of *Cdk2*^{+/+} and 24% of *Cdk2*^{-/-} MEFs treated with etoposide, suggesting that loss of CDK2 did not affect DNA-damage checkpoints. *Cdk2*^{-/-}

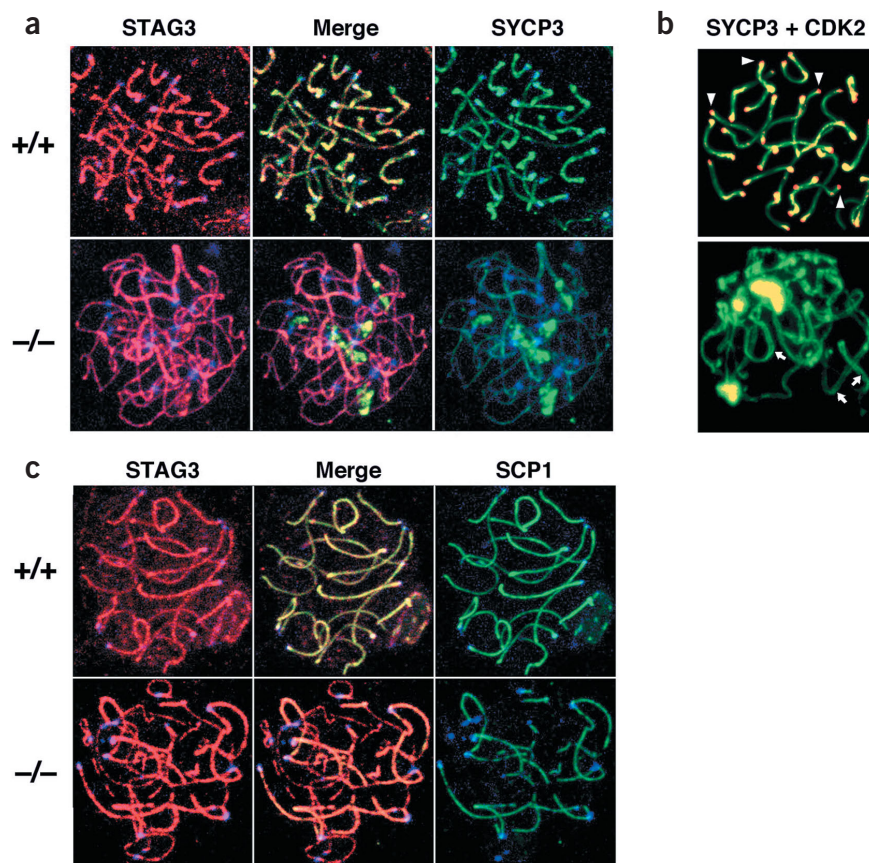


Figure 4 Distribution of synaptonemal complex components in *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} primary spermatocytes. (a) The axial element is defective in *Cdk2*^{-/-} spermatocytes. Squashed pachytene (*Cdk2*^{+/+}) and pachytene-like (*Cdk2*^{-/-}) primary spermatocytes immunostained with antibodies against STAG3 (red), SYCP3 (green) and centromeres (blue). (b) Cellular spreadings of pachytene spermatocytes from *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} mice stained for CDK2 (red) and SYCP3 (green). Arrowheads indicate the telomeric localization of CDK2 (top panel). SYCP3 signal intensity in *Cdk2*^{-/-} panel was enhanced to highlight differences in synapsis. Unsynapsed chromosomes are indicated by small arrows (bottom panel). (c) The central element is defective in *Cdk2*^{-/-} spermatocytes. Squashed pachytene (*Cdk2*^{+/+}) and pachytene-like (*Cdk2*^{-/-}) spermatocytes immunostained with antibodies against STAG3 (red), SCP1 (green) and centromeres (blue).

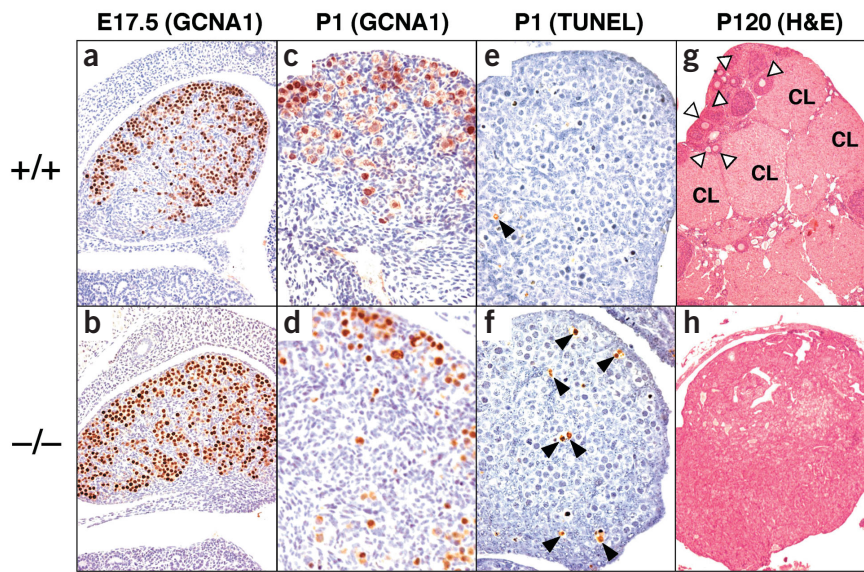


Figure 5 Defective germ cell development in *Cdk2*^{-/-} females. Samples derived from *Cdk2*^{+/+} (a,c,e,g) and *Cdk2*^{-/-} (b,d,f,h) mice. (a–d) Meiotic cells in E17.5 (a,b) and P1 (c,d) ovaries visualized by immunohistochemistry with antibodies to GCNA1. (e,f) Apoptosis in P1 ovaries determined by TUNEL assay. Arrowheads indicate stained nuclei. (g,h) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of ovaries from P120 females. Corpus lutea (CL) and secondary follicles (open arrowheads) are indicated.

MEFs became immortalized after continuous passage in culture. Whereas all wild-type embryos ($n = 8$) yielded immortal cell lines when maintained in a 3T3 protocol, only 66% of the mutant *Cdk2*^{-/-} embryos ($n = 9$) became immortal. *Cdk2*^{-/-} cells that did become immortal expressed normal levels of CDK2 and lower levels of cyclin E and cyclin A (Fig. 2g).

To eliminate the possibility that the proliferative properties of MEFs lacking CDK2 might be a consequence of developmental plasticity, we eliminated CDK2 from immortal MEFs containing a conditional *Cdk2* allele (Fig. 1). We infected *Cdk2*^{lox/-} MEFs with a retrovirus expressing Cre recombinase and selected them by single-cell cloning. Three of eight clones tested were *Cdk2*^{-/-}, and these cells had similar proliferative properties to those of *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{lox/-} MEFs, indicating that CDK2 is dispensable for cell proliferation in conditions under which plasticity is unlikely to have a role.

Defective spermatogenesis in *Cdk2*^{-/-} mice

Histological analysis of testes from young *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} male mice showed no detectable differences up to P15, when germ cells had not yet developed beyond tetraploid primary spermatocytes (Fig. 3a,b). At this time, these cells and spermatogonia are the only germ cells present in testes. Defects in *Cdk2*^{-/-} mice became visible at P20, when germ cells had completed meiosis I to form diploid secondary spermatocytes and some cells were undergoing the second meiotic division to become round spermatids. P20 *Cdk2*^{-/-} mice had no round spermatids in the seminiferous tubules (Fig. 3c,d), and there was massive apoptosis of spermatocytes (Fig. 3e,f). These observations suggest that CDK2 is essential for completing the first meiotic division in male mice. Notably, spermatogonia continued to proliferate normally in *Cdk2*^{-/-} mice even at P30, a stage at which the seminiferous tubules are almost completely depleted of germ cells (Fig. 3g,h). Testes of adult (P120) *Cdk2*^{-/-} mice were atrophic (20% the weight and size of those of wild-type littermates). Histological analysis showed normal levels of spermatogonia, but there were significantly fewer primary spermatocytes in

most seminiferous tubes and there were no post-meiotic cells, including round or elongated spermatids and spermatozoa (Fig. 3i,j). Likewise, we observed no spermatozoa in the epididymis of these mutant mice (Fig. 3k,l). The number and distribution of Sertoli and Leydig cells appeared to be normal.

Cdk2^{-/-} spermatocytes arrest in prophase I

To determine the stage at which meiosis was altered in *Cdk2*^{-/-} testes, we examined spermatocytes from P120 mice by immunofluorescence microscopy. Homozygous *Cdk2*^{-/-} spermatocytes had patterns that resemble leptotene, zygotene and pachytene stages, but we did not observe diplotene or later meiotic stages, suggesting a defect in chromosome pairing during the first meiotic division. To more precisely define the stage at which formation of the synaptonemal complex was affected, we stained *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} squashed spermatocytes with antibodies against STAG3, a marker for the cohesin axis²⁶. STAG3 immunoreactivity in *Cdk2*^{+/+} pachytene spermatocytes appeared as homogeneous fibers marking the synaptonemal complex (Fig. 4a).

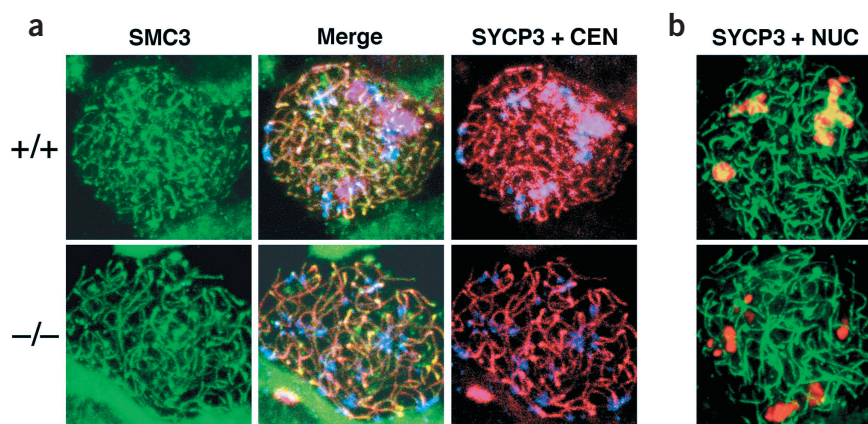
In *Cdk2*^{-/-} pachytene-like spermatocytes, these fibers appeared disorganized and of variable thickness. In addition, antibodies against SYCP3, a marker for the axial element²⁷, showed anomalous distribution of this protein along the fibers and showed the presence of protein aggregates (Fig. 4a). Using chromosome spreading techniques, we observed unsynapsed chromosomes in pachytene-like *Cdk2*^{-/-} spermatocytes (Fig. 4b). As expected, CDK2 associated with telomeric regions in *Cdk2*^{+/+} chromosomes but was absent in those derived from mutant spermatocytes (Fig. 4b). These results suggest that *Cdk2*^{-/-} spermatocytes have a defect in the formation of the axial element, yielding abundant unpaired chromosomes.

To confirm this hypothesis, we carried out similar experiments using antibodies against SCP1, a marker for the central element of the synaptonemal complex²⁸. SCP1 staining was limited to thick fibers that also stained with antibodies to STAG3 in *Cdk2*^{-/-} pachytene-like spermatocytes (Fig. 4c). The absence of SCP1 in a fraction of STAG3-positive fibers indicated that the central element was not efficiently formed in pachytene spermatocytes lacking CDK2. This deficit probably triggers the pachytene checkpoint responsible for the massive apoptosis observed in *Cdk2*^{-/-} spermatocytes.

Abnormal *Cdk2*^{-/-} dictyate oocytes

Ovaries of E17.5 *Cdk2*^{-/-} embryos, a time at which most oocytes are at the pachytene stage of meiosis I, had normal morphology and contained approximately the same number of primary oocytes as wild-type embryos (Fig. 5a,b). At P1, a time when most oocytes are at late diplotene (dictyate) stage, *Cdk2*^{-/-} ovaries had few oocytes (Fig. 5c,d) and more apoptotic cells (Fig. 5e,f). Ovaries of P14 *Cdk2*^{-/-} mice were devoid of oocytes (data not shown), suggesting that these cells died at the perinatal stage. Ovaries of adult (P120) *Cdk2*^{-/-} females were considerably atrophic, 15–20% of the size of those of wild-type counterparts. The mutant ovaries showed complete absence of follicles and corpora lutea, and in many cases the ovarian tissue was replaced with cysts lined with a layer of epithelial cells (Fig. 5g,h). The oviduct and uterus of *Cdk2*^{-/-} mice had a normal appearance (data not shown).

Figure 6 Distribution of synaptonemal complex components in *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} oocytes. (a) Distribution patterns of SMC3 (green), SYCP3 (red) and centromeres (CEN; blue) in dictyate squashed oocytes from P2 mice. Centromere clustering at discrete areas present in *Cdk2*^{+/+} oocytes is not observed in *Cdk2*^{-/-} oocytes. Nucleolar aggregates of SYCP3 remain in dictyate *Cdk2*^{+/+} oocytes but are absent in dictyate *Cdk2*^{-/-} oocytes. (b) Dictyate squashed oocytes doubly stained with antisera against SYCP3 (green) and nucleolus (NUC; red). Colocalization of SYCP3 and nucleolus signals in *Cdk2*^{+/+} oocytes is shown in yellow.



Unlike *Cdk2*^{-/-} spermatocytes, *Cdk2* mutant oocytes developed normally through the leptotene, zygotene and pachytene stages (E14.5–E18.5; data not shown). When oocytes reached the dictyate stage (P1–P2), however, we observed significant differences. At this stage, SYCP3 was no longer present in nucleolar aggregates in *Cdk2*^{-/-} oocytes but was properly distributed along fibers of fully desynapsed axial elements (Fig. 6). Moreover, centromeres, which were normally clustered in discrete nuclear locations in wild-type dictyate oocytes, appeared randomly distributed throughout the nucleus of *Cdk2*^{-/-} oocytes (Fig. 6a). These observations indicate that *Cdk2*^{-/-} oocytes also had a meiotic defect involving improper distribution of SYCP3, although this occurred at a later stage of prophase I than that of *Cdk2*^{-/-} spermatocytes.

DISCUSSION

Our results illustrate that CDK2 is not essential for mitotic cell division of most, if not all, cell types, contrary to previous thought. Moreover, removal of a conditional *Cdk2* allele from growing MEFs does not affect their proliferation. These observations indicate that our results *in vivo* are probably not due to developmental plasticity. Instead, the dispensability of CDK2 in mitotic cell division is probably due to compensation by another kinase. Phosphorylation of CDK2–cyclin A targets might be compensated by CDK1, a mitotic kinase that also associates with A-type cyclins. If this is the case, however, compensation is not mediated by increased expression of either cyclin A or CDK1. Indeed, CDK2 deficiency results in lower levels of cyclin A and CDK1, in agreement with a role for CDK2 as a positive regulator of CDK1 (ref. 29). The nature of the putative kinase responsible for compensating the activities attributed to CDK2–cyclin E is less obvious. Whereas we detected kinase activity in immunoprecipitates of cyclin A, those of cyclin E did not have kinase activity above background levels, suggesting that CDK2 could be compensated in a cyclin E–independent manner. In the case of Rb phosphorylation, this compensatory effect is probably mediated by cyclin D–dependent kinases CDK4 or CDK6 (refs. 23,25).

Mice lacking CDK2 cyclin partners have also been generated. Cyclin A1, a protein exclusively expressed in germ cells, is essential for male but not female fertility³⁰. Mice deficient for the widely expressed cyclin A2 die during early embryogenesis, possibly due to loss of CDK1–cyclin A activity³¹. Ablation of cyclin E (cyclins E1 and E2), only known to interact with CDK2, results in embryonic lethality due to a defect in trophoblast endoreplication^{32,33}. Moreover, cyclin E–deficient MEFs do not reenter the cycle after serum starvation³². These findings provide genetic evidence suggesting that E-type cyclins

may have activities independent of CDK2. In fact, cyclin E mutants unable to bind CDK2 transform rat embryo fibroblasts in combination with H-Ras³⁴. *Cdk2*^{-/-} MEFs enter DNA synthesis and complete the mitotic cell cycle with similar kinetics as *Cdk2*^{+/+} MEFs and have normal DNA damage checkpoints. Yet, *Cdk2*^{-/-} MEFs are not entirely normal. They enter crisis earlier than their wild-type counterparts and immortalize less efficiently. Likewise, they are less susceptible to transformation by oncogenes. Transfection of *Cdk2*^{-/-} cells with libraries of kinase siRNAs should provide valuable information regarding those enzymes that compensate for CDK2-specific activities. The possibility that the phosphorylation events attributed to CDK2 complexes might not be as critical for cell proliferation as previously thought, though unlikely, cannot be eliminated at this time.

Information linking CDK2 with the meiotic cell cycle is scarce. In *Drosophila*, CDK2 is required for oogenesis, but the specific process in which CDK2 is involved is unknown³⁵. Studies in vertebrate oocytes have implicated CDK2–cyclin E in metaphase II arrest mediated by cytostatic factor³⁶. In addition, CDK2 has been localized in the telomeric ends of chromosomes from leptotene to diplotene stages of meiosis³⁷. Our results establish that CDK2 is required for completion of prophase I of the meiotic cell cycle. Whereas in male germ cells, CDK2 appears to be essential for synaptonemal complex formation during the pachytene stage, female germ cells progress further to the dictyate stage, a time at which they undergo apoptosis in the absence of CDK2. The differential requirements for this kinase at distinct stages of meiotic prophase I in males and females is not surprising, as there are numerous reports indicating sex-specific regulation of the meiotic cell cycle³⁸.

These observations argue for the existence of specific meiotic substrates for CDK2. CDK2 colocalizes with MLH1 at crossover sites in midpachytene³⁷, but defects in *Mlh1*-null mice become evident only at metaphase³⁹. Other loci whose inactivation leads to phenotypes similar to that of *Cdk2*^{-/-} mice include those encoding SPO11, a protein involved in DNA double strand breaks⁴⁰; DMCL1, a protein implicated in recombination⁴¹; DNA-repair proteins, such as MSH4 (ref. 42) and MSH5 (ref. 43); and SYCP3 (ref. 44). The last is of particular relevance, as CDK2 deficiency results in perturbed distribution of SYCP3 in male and female germ cells. In normal spermatocytes, SYCP3 localizes as aggregates in nucleoli in leptotene. At later stages, SYCP3 becomes distributed along the axial element of the synaptonemal complex⁴⁵. The absence of CDK2 causes retention of SYCP3 in the nucleoli of *Cdk2*^{-/-} pachytene spermatocytes and aberrant synaptonemal complex formation. In female germ cells, CDK2 deficiency leads to a precocious disappearance of SYCP3 nucleolar aggregates and to abnormal distribution of centromeres at the dictyate stage,

without obvious differences in previous prophase I stages. Thus, CDK2 may promote proper dynamics of SYCP3, either by direct phosphorylation, or by phosphorylating other proteins involved in this process. Because *Sycp3*^{-/-} females are partially fertile⁴⁴, however, CDK2 must have additional targets.

CDK2 does not seem to be genetically altered in human tumors, but the expression of some of its direct regulators, such as cyclin E and p27, are frequently altered in human cancers⁴⁶. These observations, along with the previously assumed role of CDK2 in the cell cycle, has led to considerable efforts to inactivate CDK2 in cancer therapy. Our results predict that highly CDK2-specific inhibitors should have little, if any, effect on the proliferation of somatic cells. But we do not know whether loss of CDK2 activity would affect the proliferation of tumor cells *in vivo*. Conditional *Cdk2*^{lox/lox} mice will allow us to test this hypothesis by specifically ablating *Cdk2* from experimentally induced tumors. The outcome of such studies should be valuable to predict the clinical utility of CDK2 inhibitors in cancer therapy.

METHODS

Generation of *Cdk2*^{-/-} mice. We isolated *Cdk2* coding sequences from a 129Sv/J library (Stratagene) in a single lambda phage containing an insert of 16 kb of genomic DNA. To construct the targeting vector, we subcloned a genomic DNA fragment containing exons 1 to 5 in pBlueScript (Stratagene; Fig. 1). We inserted a PGK-*neo*^r cassette derived from pKSloxPNT⁴⁷ and flanked by *loxP* sites into the unique *SphI* site in the third intron of *Cdk2* in the same transcriptional orientation. We inserted a third *loxP* site, subcloned from pSHlox-1 (Novagen), into an *NheI* site in the first intron. This strategy introduced novel *BamHI* and *NotI* sites in this intron to help genotype the targeted allele. We inserted a PGK-thymidine kinase (TK) cassette from pPNT⁴⁸ into a unique *XbaI* site at the 3' end of the left arm (Fig. 1). We electroporated the targeting vector (20 µg), previously linearized with *SalI*, into mouse R1 ES cells⁴⁹ and selected recombinant clones in the presence of G418 and gancyclovir. Southern-blot analysis of 182 G418^R/Gan^R clones identified 11 homologous recombinants, of which only 3 had undergone recombination 5' of the *Cdk2* exons flanked by *loxP* sites (Fig. 1b). These clones were aggregated with eight cell-stage CD-1 embryos. Male chimeras derived from two of the clones, SO1-87 and SO1-80, transmitted the targeted allele (*Cdk2*^{loxneo}) to their offspring. We have observed no significant differences between mice derived from these independent clones. We crossed *Cdk2*^{+/loxneo} mice with transgenic CMV-*cre* mice²⁴ to generate *Cdk2*^{+/-} mice and mated offspring from these crosses with wild-type CD-1 mice to eliminate the CMV-*cre* transgene. Crosses between these mice generated *Cdk2*^{-/-} mice. We verified excision of exons 2 and 3 using PCR and Southern-blot analysis of genomic DNA from tail biopsies of *Cdk2*^{-/-} mice. We verified that splicing from exon 1 to 4 led to a shift of the correct open reading frame using RT-PCR followed by sequencing of the PCR product. All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

Western-blot, immunoprecipitation and kinase assays. We carried out western-blot analysis, immunoprecipitation and kinase assays as described⁵⁰. We probed nitrocellulose membranes with antibodies against CDK2 (M2), CDK1 (17), CDK4 (C22), cyclin A (H432), cyclin E (M20), p21 (C19), ERK1 (C16; all from Santa Cruz Biotechnology); cyclin D1 (DCS6; NeoMarkers); p27 (Transduction Laboratories); phosphorylated Rb-S795 (Cell Signaling Technology); and phosphorylated Rb-T821 (Biosource International). For kinase assays, we used 1 µg of mouse Rb protein fragment (amino acids 769–921; 769, Santa Cruz Biotechnology) and histone H1 from calf thymus (Roche) as substrates.

MEF assays. We obtained primary MEFs from E14.5 embryos and cultured them in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). For proliferation assays, we plated 5 × 10⁴ cells on six-well plates in duplicate. For colony formation assays, we seeded 5–20 × 10³ cells on 10-cm plates in duplicate and cultured them for 2 weeks. We stained the plates with methylene blue and scored the colonies. To analyze S-phase entry, we incubated 10⁶ cells per 10-cm dish in DMEM supplemented

with 0.1% FBS for 60 h. We added DMEM supplemented with 10% FBS and then collected cells at the indicated times, stained them with propidium iodide and analyzed by fluorescence-activated cell sorting using a Coulter flow cytometer. We carried out focus formation assays as described⁵¹ using 10 µg of pAL8 and pCMV-E1A DNAs. For etoposide treatment, we incubated 10⁶ cells per 10-cm dish with 5 µM etoposide (Sigma-Aldrich) for 24 h. We washed cells with phosphate-buffered saline (PBS) and cultured them for various times in DMEM supplemented with 10% FBS. We carried out immortalization assays following a classical 3T3 protocol.

Histology and immunohistochemistry. We carried out conventional staining with hematoxylin and eosin on 3-µm sections of paraffin-embedded tissues after fixation in formalin for 24 h. We detected germ cells by immunohistochemistry using an antibody to GCNA1 (a gift from G.C. Enders, Department of Anatomy and Cell Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas, USA). We monitored apoptosis by TUNEL assays (ApopDETEK, Enzo Life Sciences) and measured spermatogonia proliferation by Ki67 immunostaining using a monoclonal antibody (MIB-1; Dako).

Immunofluorescence analysis of germ cells. To analyze the distribution of synaptonemal complex components in mouse germ cells, we used a squash procedure that maintains the spatial organization of the cells³⁰ or a spreading technique⁵². We stained samples with antibodies against human STAG3 (mouse polyclonal antibody m228; ref. 26), human SMC3 (rabbit polyclonal antibody K987 raised against amino acids 978–1217 expressed in *Escherichia coli*), rat SYCP3 (rabbit polyclonal antibody K921 and mouse polyclonal antibody N6, both raised against the final 21 C-terminal amino acids), rat SCP1 (rabbit polyclonal antibody K919 raised against the final 23 C-terminal amino acids) and human CDK2 (D-12, Santa Cruz Biotechnology). We obtained antisera to centromere and nucleolus from autoimmune individuals (gifts from G. Roy, Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain). Secondary antibodies included Alexa 488-labeled goat antibody to rabbit IgG (Molecular Probes), Cy5-labeled goat antibody to human IgG and Cy3-labeled goat antibody to rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). For immunofluorescence on squashed mouse germ cells, we diluted primary antibodies 1:50 in PBS with 10% goat serum (GibcoBRL-Life Technologies); we used secondary antibodies (diluted 1:200) in the same conditions. For the spreading procedure, we diluted rabbit polyclonal K921 antibodies to 1:200 and mouse monoclonal D-12 antibody to 1:10. We diluted primary antibodies in PBS containing 10% goat serum; we used secondary antibodies in the same conditions, diluted 1:400.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Sicinski and B. Amati for communicating results before publication and for discussions; C. Gómez, M. Riffo, M. Muñoz, M. San Román, R. Villar and R. González for technical assistance; J.M. Buesa, F. Roncal, L. Gómez and R. Fernández for generating SMC3, SCP1 and SYCP3 antibodies; and G.C. Enders and G. Roy for GCNA1 and human autoimmune sera, respectively. The support provided by the Immunohistochemistry and Animal Facility Units of the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas is also greatly appreciated. The early phases of this work were carried out at the Centro Nacional de Biotecnología. This work was supported by grants from the V Framework Program of the European Union (to M.B.) and from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (to M.B. and to S.O.). The Department of Immunology and Oncology is supported by the Spanish Council for Scientific Research and by Pfizer.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 4 June; accepted 4 August 2003

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>

1. Tsai, L.-H., Harlow, E. & Meyerson, M. Isolation of the human *Cdk2* gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* **353**, 174–177 (1991).
2. Elledge, S.J. & Spottswood, R. A new human p34 protein kinase, Cdk2, identified by complementation of a *cdc28* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1. *EMBO J.* **10**, 2653–2659 (1991).
3. Sherr, C.J. Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672–1677 (1996).
4. Lundberg, A.S. & Weinberg, R.A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes.

- Mol. Cell. Biol.* **18**, 753–761 (1998).
5. Morris, L., Allen, K.E. & La Thangue, N.B. Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 232–239 (2000).
 6. Furstenthal, L., Kaiser, B.K., Swanson, C. & Jackson, P.K. Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication. *J. Cell Biol.* **152**, 1267–1278 (2001).
 7. Ma, T. *et al.* Cell cycle-regulated phosphorylation of p220^{NPAT} by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev.* **14**, 2298–2313 (2000).
 8. Zhao, J. *et al.* NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* **14**, 2283–2297 (2000).
 9. Okuda, M. *et al.* Nucleophosmin/B23 is a target of Cdk2/Cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**, 127–140 (2000).
 10. Fisk, H.A. & Winey, M. The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell* **106**, 95–104 (2001).
 11. Sheaff, R.J. *et al.* Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* **11**, 1464–1478 (1997).
 12. Vlach, J., Hennecke, S. & Amati, B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* **16**, 5334–5344 (1997).
 13. Zou, L. & Stillman, B. Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3086–3096 (2000).
 14. Koepp, D.M. *et al.* Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**, 173–177 (2001).
 15. Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J. & Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* **2**, 396–410 (1999).
 16. Sorensen, C.S. *et al.* A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex-Cdh1 and cyclin A-cdk2 during cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3692–3703 (2001).
 17. Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J. & Nigg, E.A. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.* **1**, 88–93 (1999).
 18. Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**, 961–971 (1992).
 19. Tsai, L.H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E. & Riabowol, K. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* **8**, 1593–1602 (1993).
 20. Van den Heuvel, S. & Harlow, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050–2054 (1993).
 21. Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. & Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2612–2624 (1995).
 22. Hu, B., Mitra, J., van den Heuvel, S. & Enders, G.H. S and G2 phase roles for cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2755–2766 (2001).
 23. Tetsu, O. & McCormick, F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* **3**, 233–245 (2003).
 24. Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. A *cre*-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of *loxP*-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5080–5081 (1995).
 25. Zarkowska, T. & Mittnacht, S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **272**, 12738–12746 (1997).
 26. Prieto, I. *et al.* Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 761–766 (2001).
 27. Lammers, J.H. *et al.* The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1137–1146 (1994).
 28. Meuwissen, R.L. *et al.* A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* **11**, 5091–5100 (1992).
 29. Guadagno, T.M. & Newport, J.W. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* **84**, 73–82 (1996).
 30. Liu, D. *et al.* Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* **20**, 377–380 (1998).
 31. Murphy, M. *et al.* Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat. Genet.* **15**, 83–86 (1997).
 32. Geng, Y. *et al.* Cyclin E function in the mouse. *Cell* (in the press).
 33. Parisi, T. *et al.* Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* (in the press).
 34. Geisen, C. & Moroy, T. The oncogenic activity of Cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 39909–39918 (2002).
 35. Lane, M.E. *et al.* A screen for modifiers of Cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* **155**, 233–244 (2000).
 36. Tunquist, B.J., Schwab, M.S., Chen, L.G. & Maller, J.L. The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr. Biol.* **12**, 1027–1033 (2002).
 37. Ashley, T., Walpita, D. & de Rooij, D.G. Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* **114**, 685–693 (2001).
 38. Hunt, P.A. & Hassold, T.J. Sex matters in meiosis. *Science* **296**, 2181–2183 (2002).
 39. Eaker, S., Cobb, J., Pyle, A. & Handel, M.A. Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev. Biol.* **249**, 85–95 (2002).
 40. Romanienko, P.J. & Camerini-Otero, R.D. The mouse *Spo11* gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell* **6**, 975–987 (2000).
 41. Pittman, D.L. *et al.* Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* **1**, 697–705 (1998).
 42. Kneitz, B. *et al.* MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev.* **14**, 1085–1097 (2000).
 43. de Vries, S.S. *et al.* Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* **13**, 523–531 (1999).
 44. Yuan, L. *et al.* The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell* **5**, 73–83 (2000).
 45. Scherthan, H. *et al.* Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* **134**, 1109–1125 (1996).
 46. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 222–231 (2001).
 47. Hanks, M.C. *et al.* *Drosophila engrailed* can substitute for mouse *Engrailed1* function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* **125**, 4521–4530 (1998).
 48. Tybulewicz, V.L., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T. & Mulligan, R.C. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* **65**, 1153–1163 (1991).
 49. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abromow-Newerly, W. & Roder, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8424–8428 (1993).
 50. Sotillo, R. *et al.* Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J.* **20**, 6637–6647 (2001).
 51. Latres, E. *et al.* Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* **19**, 3496–3506 (2000).
 52. Hulten, M., Barlow, A.L. & Tease, C. Meiotic studies in humans. In *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis. A Practical Approach* 3rd edn. (ed. Rooney, D.E.) 211–236 (Oxford University Press, Oxford, 2001).

Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27^{Kip1} and p21^{Cip1}

Alberto Martín,¹ Junko Odajima,¹ Sarah L. Hunt,¹ Pierre Dubus,² Sagrario Ortega,^{1,3} Marcos Malumbres,^{1,*} and Mariano Barbacid^{1,*}

¹Molecular Oncology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28029 Madrid, Spain

²E.A. 2406, Histologie et Pathologie Moléculaire, University of Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France

³Present address: Biotechnology Program, CNIO, 28029 Madrid, Spain

*Correspondence: malumbres@cnio.es (M.M.); barbacid@cnio.es (M.B.)

Summary

p27^{Kip1} and p21^{Cip1} are thought to suppress tumor growth and prevent cell cycle progression by inhibiting Cdk2-cyclin E/A kinases. Since Cdk2 is dispensable for mitotic cell division, we analyzed the activity of these inhibitors in Cdk2-deficient cells. Ectopic expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} efficiently inhibits cell cycle progression of Cdk2^{-/-} fibroblasts. Loss of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} confers similar proliferative advantages to Cdk2^{+/+} and Cdk2^{-/-} cells. Moreover, Cdk2 is dispensable for p21^{Cip1}-induced cell cycle arrest after DNA damage. Finally, ablation of Cdk2 in p27^{Kip1} null mice does not suppress their phenotypic defects, including development of pituitary tumors. These results indicate that Cdk2 is not an essential target for p27^{Kip1} and p21^{Cip1} in cell cycle inhibition and tumor suppression.

Introduction

Coordinated regulation of cell cycle progression is essential for normal development and homeostasis. Two families of cell cycle inhibitors play vital roles in this process (reviewed in Sherr and Roberts, 1999). The INK4 protein family specifically binds to Cdk4 and Cdk6 to inhibit interaction with their activating subunits, the D type cyclins. On the other hand, the Cip/Kip family of proteins, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, and p57^{Kip2}, form inactive complexes with Cdk2-cyclin E and Cdk2-cyclin A. p21^{Cip1} and p27^{Kip1} also bind to Cdk4/6-cyclin D complexes but do not interfere with their kinase activity, at least under stoichiometric conditions (Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997). Indeed, these cell cycle inhibitors contribute to the formation of stable Cdk4/6-cyclin D complexes during the early phases of the cell cycle (Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999). More recently, the possibility that p21^{Cip1} and p27^{Kip1} may have additional roles outside the nucleus is receiving increasing attention (reviewed in Denicourt and Dowdy, 2004).

In spite of their similar mechanism of action, p21^{Cip1} and p27^{Kip1} play distinct biological roles within the cell. p21^{Cip1} is a transcriptional target of p53 and it is believed to be one of the main effectors of p53-mediated cell cycle arrest (reviewed in Nakayama and Nakayama, 1998; Sherr and Roberts, 1999). In contrast, p27^{Kip1} appears to be a primary negative regulator

during normal cell proliferation in a variety of cell types (Sherr and Roberts, 1999). Expression of p27^{Kip1} is controlled by the forkhead family of transcription factors, a group of downstream effectors of the PI3Kinase/Akt signal transduction pathway (Collado et al., 2000). Moreover, p21^{Cip1} and p27^{Kip1} differ at their carboxy-terminus, a domain that provides them with specific functions (Nakayama and Nakayama, 1998; Sherr and Roberts, 1999). For instance, p21^{Cip1} uses this domain to bind to the proliferating-cell nuclear antigen (PCNA), a DNA polymerase delta processivity factor, thus preventing DNA replication (Chen et al., 1995; Waga et al., 1994; Li et al., 1994; Luo et al., 1995).

Targeted deletion of p21^{Cip1} in mice does not cause major phenotypic abnormalities. However, p21^{Cip1}-deficient mice develop a variety of tumors, albeit with long latencies (Martín-Caballero et al., 2001). Moreover, p21^{Cip1}^{-/-} cells are significantly deficient in their ability to arrest in G1 in response to DNA damage (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995). Ablation of p27^{Kip1} in mice results in hyperplasia leading to generalized organomegaly and increased body size. Moreover, these animals develop retinal dysplasia and pituitary tumors of the intermediate lobe (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996). p27^{Kip1} heterozygous mice are more susceptible to radiation- or ENU-induced tumors. None of these tumors loses its wild-type allele, indicating that p27^{Kip1}

SIGNIFICANCE

Controlled synthesis and degradation of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} are key events in regulating cell cycle progression. It is generally accepted that p27^{Kip1}, and the related p21^{Cip1} inhibitor, block the cell cycle by inhibiting the kinase activity of Cdk2-cyclin E/A complexes. Here, we provide genetic evidence that Cdk2 is dispensable for the inhibitory activity of p27^{Kip1} and p21^{Cip1} during the G1 phase of the cell cycle and for their tumor-suppressing properties. Whereas the precise mechanisms by which p27^{Kip1} and p21^{Cip1} block cell cycle progression remain to be defined, our findings suggest either that Cdk2 does not mediate the activity of these inhibitors or, alternatively, that cells possess compensatory mechanisms that efficiently bypass their requirement for Cdk2.

is haploinsufficient for tumor suppression (Fero et al., 1998). Cultured cells derived from *p27^{Kip1}-/-* mice show partial mitogen independence (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996). In human tumors, the levels of p21^{Cip1} expression are not frequently altered. Yet, p21^{Cip1} expression cannot be induced in those tumors that do not express an active p53 tumor suppressor. The locus encoding p27^{Kip1} is also not mutated in most human tumors. However, the levels of p27^{Kip1} protein are frequently compromised in a variety of tumor types. This phenotype often correlates with increased tumor aggressiveness and poor prognosis (reviewed in Bloom and Pagano, 2003; Blain et al., 2003).

The observation that Cip/Kip inhibitors stabilize Cdk4/6-cyclin D complexes (Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999) has led to the proposal that Cdk4/6-cyclin D kinases may contribute to cell cycle progression by sequestering Cip/Kip inhibitors away from other Cdks, mainly Cdk2. Decreased levels of p27^{Kip1} would generate sufficient amounts of active Cdk2-cyclin E complexes to phosphorylate p27^{Kip1}, a signal required for its degradation by the SCF-Skp2 proteasome (reviewed in Reed, 2003). Once most of p27^{Kip1} has been removed, fully active Cdk2-cyclin E complexes would be available to completely phosphorylate the Rb protein family, thus allowing cells to progress from the G1 to the S phase of the cell cycle (Sherr and Roberts, 1999; Reed 2003).

However, the central role attributed to Cdk2 in cell cycle progression has been recently challenged by the observation that mice lacking this kinase develop normally (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003). Moreover, Cdk2-deficient cells proliferate well in culture and re-enter cell cycle after serum starvation without significant delay (Ortega et al., 2003). Presumably, ablation of Cdk2 is compensated by other Cdks. However, Cdk2 is essential for the first meiotic division of both male and female germ cells, an activity that cannot be compensated by any other kinase (Ortega et al., 2003). These findings have raised questions regarding other proposed roles for Cdk2 based on biochemical or cell biology studies. One such proposed role involves mediation of the cell cycle inhibitory and tumor suppressor activities of p27^{Kip1} and p21^{Cip1}.

In this study, we report that overexpression of p27^{Kip1} and p21^{Cip1} induces cell cycle arrest in the absence of Cdk2. Moreover, none of the deficiencies analyzed in *p27^{Kip1}-/-* and *p21^{Cip1}-/-* cells is reversed by deletion of Cdk2. Perhaps more importantly, ablation of Cdk2 does not reverse organomegalia in *p27^{Kip1}-/-* mice, nor prevent development of pituitary tumors. These results provide genetic evidence that Cdk2 is not an essential target for p21^{Cip1} or p27^{Kip1}. Moreover, they raise a note of caution regarding the suitability of Cdk2 as a target for therapeutic intervention, at least in those tumors lacking Cip/Kip tumor suppressors.

Results

p27^{Kip1} and p21^{Cip1} block cell cycle progression in the absence of Cdk2

To investigate whether Cip/Kip inhibitors cause cell cycle arrest in the absence of Cdk2, early-passage *Cdk2^{+/+}* and *Cdk2^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were infected with retro-

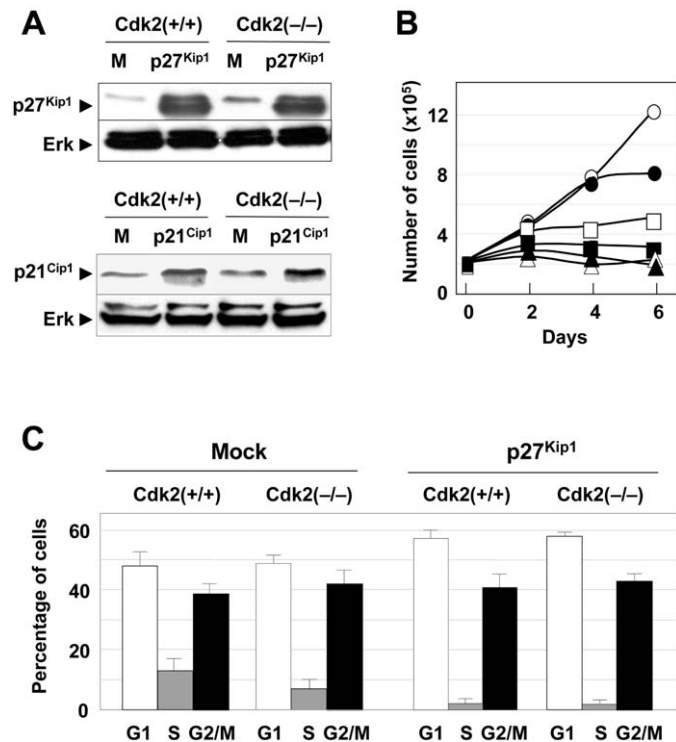


Figure 1. Ectopic expression of p27^{Kip1} and p21^{Cip1} arrests cell cycle progression in wild-type and Cdk2-deficient cells

A: Expression levels of p27^{Kip1} and p21^{Cip1} in *Cdk2^{+/+}* and *Cdk2^{-/-}* primary MEFs after retroviral infection with either empty virus (M) or with viruses encoding p27^{Kip1} or p21^{Cip1} proteins. Expression of the Erk protein was used as loading control. Migration of the proteins is indicated by arrowheads.

B: Growth curves of *Cdk2^{+/+}* (open symbols) and *Cdk2^{-/-}* (filled symbols) primary MEFs after retroviral infection with either empty virus (circles) or with viruses encoding p27^{Kip1} (triangles) or p21^{Cip1} (squares).

C: DNA content of *Cdk2^{+/+}* or *Cdk2^{-/-}* MEFs after infection with either empty virus (Mock) or with a retrovirus encoding p27^{Kip1}. The percentage of cells in G1 (open bars), S (gray bars), or G2/M (solid bars) phases of the cell cycle is indicated. The means \pm SD for 6 different embryos per genotype and 3 different experiments are shown.

viruses expressing p27^{Kip1} or p21^{Cip1} (Figure 1A). Ectopic expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} halted the proliferation of these primary MEFs regardless of the presence or absence of Cdk2 (Figure 1B). As expected, p27^{Kip1} induced cell cycle arrest in both G1 and G2/M, presumably by inhibiting the kinase activity of Cdk2 bound to cyclin E and cyclin A, respectively (Figure 1C). Surprisingly, p27^{Kip1} also blocked cell cycle progression in G1 (58% of the cells) and G2/M (42%) in the absence of Cdk2. It could be hypothesized that cell cycle arrest in G2/M may be mediated by Cdk1, a known target of p27^{Kip1} (reviewed in Pagano, 2004). However, the mechanism by which p27^{Kip1} induces cell cycle arrest in G1 in *Cdk2^{-/-}* cells is less obvious.

To investigate the effect of expressing p27^{Kip1} or p21^{Cip1} on various Cdk-cyclin complexes in the absence of Cdk2, we assayed their kinase activity present in the corresponding immunoprecipitates derived from *Cdk2^{+/+}* and *Cdk2^{-/-}* MEFs (Figure 2). As expected, whereas Cdk2 kinase activity was dramatically decreased in wild-type cells, ectopic expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} had no effect on Cdk4 kinase, at least as determined

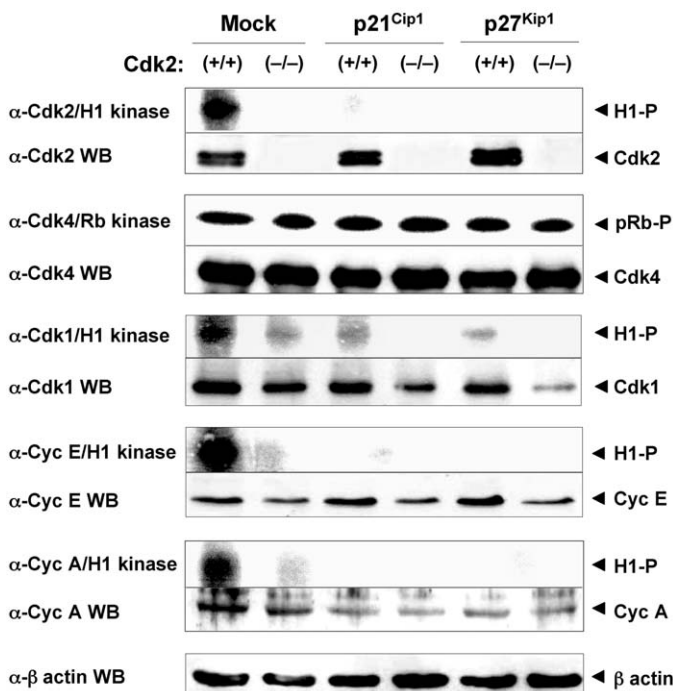


Figure 2. Expression levels and protein kinase activity of Cdk2, Cdk4, Cdk1, cyclin E, and cyclin A immunoprecipitates obtained from *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} MEFs ectopically expressing p27^{Kip1} or p21^{Cip1} proteins

Cell extracts obtained from *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} MEFs either mock infected or infected with retroviruses expressing p21^{Cip1} or p27^{Kip1} proteins were incubated with antibodies against Cdk2, Cdk4, Cdk1, cyclin E, and cyclin A, and the resulting immunoprecipitates assayed for kinase activity using histone H1 (H1 kinase) or a fragment of the retinoblastoma protein (Rb kinase) as substrates. Cell extracts were analyzed by Western blot with the same antibodies to determine the levels of expression of each of the above Cdks and cyclins. Results are depicted immediately below the corresponding kinase assay. The migration of the Cdks, cyclins, and phosphorylated substrates H1-P and pRb-P is indicated by arrowheads. A Western blot using β -actin antibodies was used as a loading control.

by its ability to phosphorylate pRb (Figure 2 and Supplemental Data). In agreement with previous studies, ectopic expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} significantly reduced Cdk1 kinase activity in wild-type MEFs (Toyoshima and Hunter, 1994; Harper et al., 1995). In *Cdk2*^{-/-} MEFs, Cdk1 kinase activity was completely inhibited upon p27^{Kip1} or p21^{Cip1} expression, a result that may account for the fraction of *Cdk2*^{-/-} cells arrested in G2/M (Figure 1C) (Pagano, 2004). It should be noted that Cdk1 kinase activity was reduced in cells lacking Cdk2, most likely a consequence of the lower levels of Cdk1 expression in *Cdk2* null cells (Ortega et al., 2003). Cyclin E-associated kinase activity, presumably mediated by Cdk2, was also inhibited by p27^{Kip1} or p21^{Cip1} expression regardless of whether we used histone H1 or pRb protein as a substrate (see Figure 2 and Supplemental Data). No cyclin E associated kinase activity could be observed in immunoprecipitates obtained from *Cdk2*^{-/-} cells, regardless of the expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} (Ortega et al., 2003). In agreement with previous studies (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003), Cyclin A-associated kinase activity is greatly decreased in *Cdk2* null cells (Figure 2). This residual activity, presumably mediated by Cdk1-cyclin A complexes,

was completely eliminated upon expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1} (Figure 2), thus providing further support to the concept that these inhibitors also block Cdk1 kinase activity.

Biological activity of mutant p27^{Kip1} and p21^{Cip1} proteins is independent of Cdk2

To determine whether binding of p27^{Kip1} to Cdk-cyclin complexes is required for its cell cycle inhibitory properties in *Cdk2* null cells, we generated two p27^{Kip1} mutants, p27^{Kip1} F64A and p27^{Kip1} 13M. p27^{Kip1} F64A has a single F64A mutation that reduces binding to the Cdk catalytic subunit (Kwon and Nordin, 1998). p27^{Kip1} 13M carries two additional mutations (L32H;P35A) within a putative cyclin binding motif based on sequence homology with p21^{Cip1} (Lin et al., 1996). Thus, p27^{Kip1} 13M should not be able to bind either Cdk or cyclin subunits. As illustrated in Figure 3A, the p27^{Kip1} F64A mutant binds to all Cdk and cyclin subunits examined with an efficiency similar to that of the wild-type protein. Whether recognition of the catalytic subunits Cdk1, Cdk2, and Cdk4 was mediated by binding to their cognate cyclins was not examined. In contrast, the triple mutant, p27^{Kip1} 13M, was not able to recognize any Cdk-cyclin complexes as determined by immunoprecipitation assays (Figure 3B). Next, we examined whether these mutant p27^{Kip1} proteins retained cell cycle inhibitory properties. As illustrated in Figure 3C, p27^{Kip1} F64A was almost as efficient as the wild-type protein in blocking cell cycle progression as determined by BrdU incorporation. Its inhibitory activity was the same in *Cdk2*^{+/+} and *Cdk2*^{-/-} MEFs. In contrast, p27^{Kip1} 13M completely lost its ability to inhibit BrdU incorporation in both wild-type and *Cdk2*^{-/-} MEFs. These observations indicate a strong correlation between cell cycle inhibitory activity of p27^{Kip1} and its ability to interact with Cdk-cyclin complexes, regardless of the presence or absence of Cdk2.

In addition to Cdk-cyclin complexes, p21^{Cip1} also binds to PCNA, preventing its interaction with the catalytic subunit of DNA polymerase delta, an enzyme required for DNA replication (Luo et al., 1995; Chen et al., 1995). Expression of p21^{Cip1} Δ , a mutant p21^{Cip1} protein that cannot bind to PCNA (Cayrol et al., 1998), also caused cell cycle arrest in MEFs regardless of *Cdk2* expression (see Supplemental Data). These results suggest that PCNA is not a major target for p21^{Cip1}, at least in MEFs.

Loss of Cdk2 does not suppress the proliferative advantages of cells lacking p27^{Kip1} and p21^{Cip1}

To provide genetic evidence for a possible epistatic interaction between Cip/Kip inhibitors and Cdk2, we examined the consequences of ablating Cdk2 in cells defective for either p27^{Kip1} or p21^{Cip1}. Double knockout *p27^{Kip1}-/-;Cdk2*^{-/-} and *p21^{Cip1}-/-;Cdk2*^{-/-} mice were born at the expected Mendelian ratio and did not display any defects other than those previously reported for their parental single knockout animals. Primary *p27^{Kip1}-/-;Cdk2*^{-/-} and *p21^{Cip1}-/-;Cdk2*^{-/-} MEFs, isolated from mid-gestation embryos, displayed increased proliferation rates similar to those of *p27^{Kip1}* null or *p21^{Cip1}* null cells (Figure 4A), thus indicating that loss of Cdk2 does not abrogate the proliferative advantage conferred by the absence of p27^{Kip1} or p21^{Cip1}. Similar results were obtained in colony formation assays. For instance, whereas we scored 25 \pm 14 colonies after seeding 3,000 wild-type cells, *p21^{Cip1}-/-* MEFs yielded 114 \pm 16 colonies, a figure very similar to that obtained in the corresponding MEFs lacking both p21^{Cip1} and Cdk2 (118 \pm 13 colo-

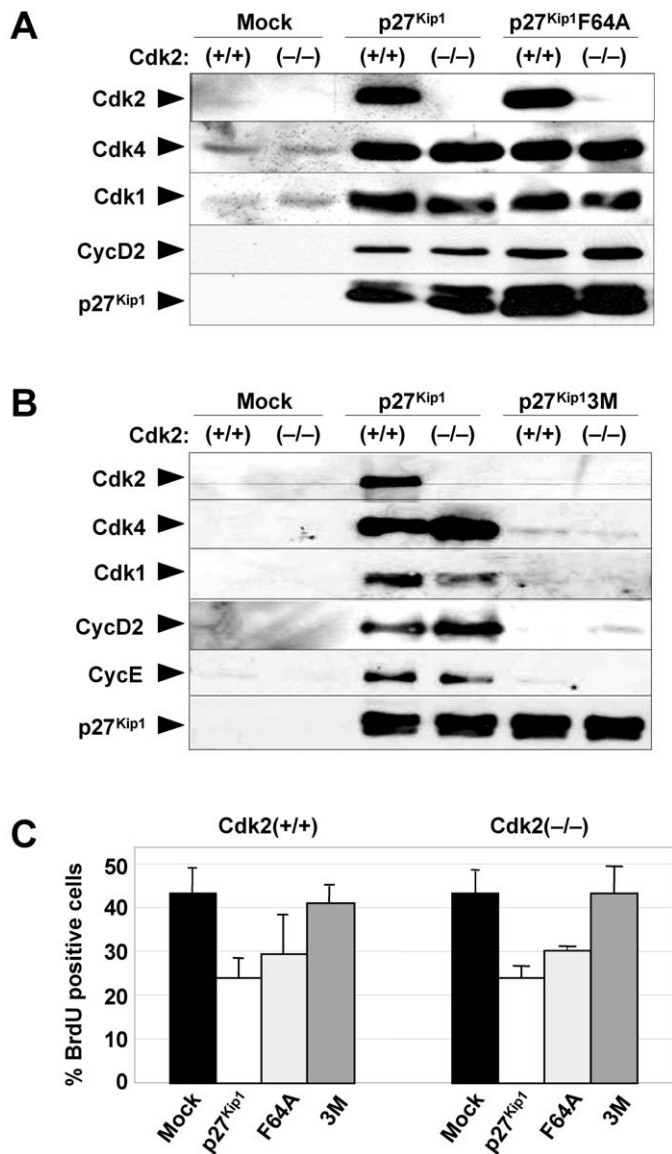


Figure 3. Cell cycle inhibitory properties of mutant p27^{Kip1} proteins

A: Cdk2^{+/+} and Cdk2^{-/-} MEFs infected with empty retrovirus (mock) or with viruses expressing Flag-tagged wild-type p27^{Kip1} or mutated p27^{Kip1}F64A proteins.

B: Cdk2^{+/+} and Cdk2^{-/-} MEFs infected with empty retrovirus (mock) or with viruses expressing Flag-tagged wild-type p27^{Kip1} or mutated p27^{Kip1}3M proteins. p27^{Kip1} complexes were immunoprecipitated using anti-Flag antibodies, and the levels of the indicated proteins, including Cdk2, Cdk4, Cdk1, cyclin D2, cyclin E, and p27^{Kip1}, were detected by Western blot analysis using the corresponding antibodies. Migration of these proteins is indicated by arrowheads.

C: BrdU incorporation (expressed as percentage of positive cells) in Cdk2^{+/+} and Cdk2^{-/-} immortal MEFs either mock infected (Mock; filled bars) or infected with retroviruses encoding Flag-tagged p27^{Kip1} wild-type (p27^{Kip1}; open bars) or mutated Fg-p27^{Kip1}F64A (F64A; light gray bars) and Fg-p27^{Kip1}3M (3M; dark gray bars) proteins. The average value of two different clones per genotype is represented. At least two different experiments were performed with all the cell lines.

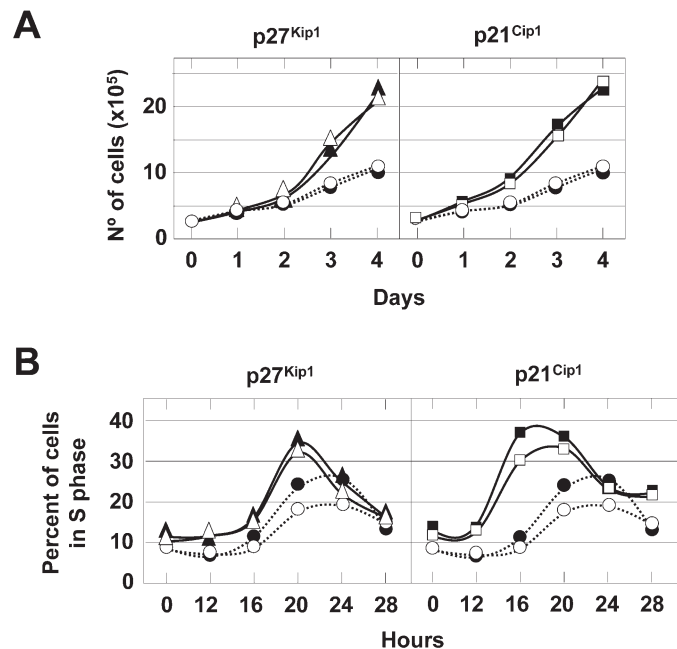


Figure 4. Ablation of Cdk2 does not affect the proliferative properties of cells lacking p27^{Kip1} or p21^{Cip1} inhibitors

A: Proliferation rates of primary MEFs deficient in p27^{Kip1} (triangles) or p21^{Cip1} (squares) in the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of Cdk2. Curves depicting the proliferation rates of wild-type (closed circles) and Cdk2^{-/-} (open circles) primary MEFs are also indicated by dotted lines.

B: Kinetic analysis of S phase entry of primary MEFs deficient in p27^{Kip1} or p21^{Cip1} in the presence or absence of Cdk2. Kinetics of S phase entry of wild-type and Cdk2 primary MEFs are also indicated. Symbols are those indicated in **A**.

nies). Finally, quiescent p27^{Kip1} and p21^{Cip1} deficient MEFs enter S phase 4 to 6 hr earlier than wild-type cells upon serum stimulation, a differential effect also observed in primary p27^{Kip1}^{-/-};Cdk2^{-/-} and p21^{Cip1}^{-/-};Cdk2^{-/-} MEFs (Figure 4B), suggesting that the shortening in S phase entry is not mediated by constitutively active Cdk2.

Cdk2 is not essential for p21^{Cip1}-mediated cell cycle arrest after DNA damage

p21^{Cip1} is one of the major effectors of cell cycle arrest induced upon DNA damage (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995). To examine the contribution of Cdk2 to these DNA damage checkpoints, we exposed wild-type, Cdk2^{-/-}, p21^{Cip1}^{-/-}, and p21^{Cip1}^{-/-};Cdk2^{-/-} primary MEFs to γ irradiation or to etoposide. Serum-starved cells were irradiated in suspension using a single dose of 10 Gy and stimulated with 10% of serum to reenter the cell cycle. BrdU was added to allow detection of cells entering S phase. Irradiated wild-type and Cdk2^{-/-} MEFs showed a 60% reduction in the number of BrdU-positive cells and a concomitant 10%–15% increase in the G1 population relative to nonirradiated samples (Figure 5A). Ablation of p21^{Cip1} resulted in impaired checkpoint arrest, since p21^{Cip1} null cells maintained high levels of BrdU incorporation and lacked G1 arrest. As illustrated in Figure 5A, double mutant p21^{Cip1}^{-/-};Cdk2^{-/-} cells also displayed increased BrdU incor-

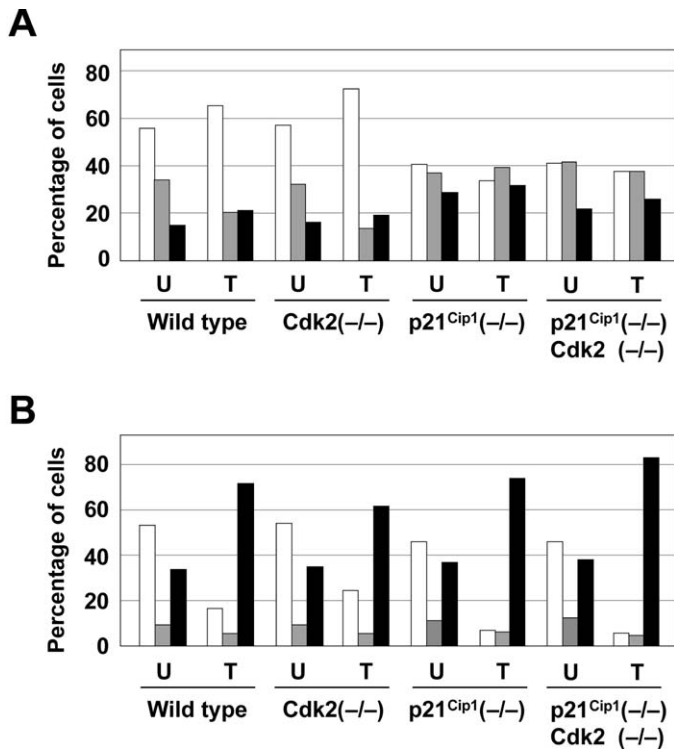


Figure 5. DNA damage checkpoint in MEFs exposed to γ radiation and etoposide

A: Percentage of cells either untreated (U) or exposed (T) to γ radiation in G1 (open bars), S (gray bars), or G2/M (filled bars) phases of the cell cycle. The corresponding genotype of each of the treated cells is indicated.

B: As above except that cells were treated with etoposide.

poration and failed to arrest in G1. Similar results were obtained using etoposide, another DNA damaging agent (Figure 5B). Whereas wild-type cells arrested both in G1 and G2/M, *p21^{Cip1}* null cells treated with etoposide were not able to arrest in G1, and most of them accumulated in G2/M. As illustrated in Figure 5B, this effect was also independent of Cdk2. These observations provide genetic evidence against the concept that *p21^{Cip1}* mediates cell cycle arrest at the DNA damage checkpoint by blocking Cdk2 activity.

Cip/Kip tumor suppressor activity does not require Cdk2

p27^{Kip1} and *p21^{Cip1}*-deficient MEFs show slightly increased susceptibility to cellular transformation in vitro. Ectopic expression of Ras and E1A oncogenes induced significantly more foci of transformed cells in either *p27^{Kip1}* and *p21^{Cip1}* null MEFs than in wild-type cells. Whereas we scored 17 ± 8 foci in wild-type cells, we observed 20 ± 7 and 33 ± 7 in *p27^{Kip1}* and *p21^{Cip1}* null MEFs, respectively. When similar experiments were carried out using primary MEFs lacking Cdk2, results were essentially identical. That is, we observed 23 ± 9 foci in *p27^{Kip1};-Cdk2* cells, and 27 ± 5 foci in *p21^{Cip1};-Cdk2* MEFs, respectively. These observations suggest that the increased susceptibility to transformation by Ras and E1A oncogenes of Cip/Kip deficient cells is not due to increased Cdk2 activity.

To examine the genetic interactions between Cdk2 and Cip/

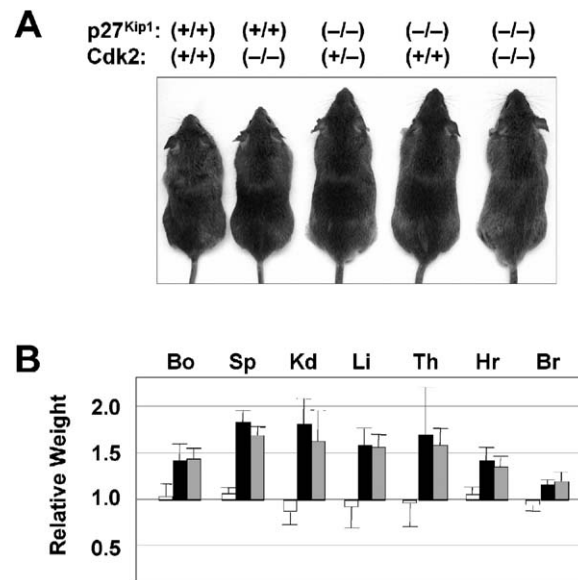


Figure 6. Loss of Cdk2 does not abrogate organomegalia of *p27^{Kip1}* null mice

A: Mice lacking *p27^{Kip1}* have larger size regardless of the presence or absence of Cdk2. The genotypes of the representative mice depicted in this photograph are indicated.

B: Total body weight (Bo) and weight of individual organs, including spleen (Sp), kidney (Kd), liver (Li), thymus (Th), heart (Hr), and brain (Br) of *Cdk2*^{-/-} (open bars), *p27^{Kip1}*^{-/-} (black bars), and *p27^{Kip1}*^{-/-};*Cdk2*^{-/-} (gray bars) mice relative to the corresponding weights of wild-type mice. The means \pm SD for 3 different animals from each genotype are shown.

Kip inhibitors in vivo, we analyzed the phenotype of mice deficient for Cdk2 and *p27^{Kip1}*. Ablation of *p27^{Kip1}* in mice results in hyperplasia leading to generalized organomegalia and increased body size. Moreover, these animals develop retinal dysplasia and pituitary tumors of the intermediate lobe (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996). *p27^{Kip1}*^{-/-};*Cdk2*^{-/-} double mutant mice weighted 50% to 60% more than wild-type and *Cdk2*^{-/-} mice and displayed widespread organomegalia, similar to *p27^{Kip1}*^{-/-} animals (Figure 6). Testes and ovaries of *p27^{Kip1}*^{-/-};*Cdk2*^{-/-} mutant mice also displayed reduced size similar to those of *Cdk2* null mice (data not shown). Close examination of these tissues revealed complete absence of germ cells as well as an atrophic architecture indistinguishable from that of *Cdk2*^{-/-} single mutant mice (Ortega et al., 2003) (data not shown). These observations indicate that the meiotic defects that result from ablation of Cdk2 are independent of *p27^{Kip1}*.

p27^{Kip1}^{-/-};*Cdk2*^{-/-} mice displayed the same retinal defects observed in *p27^{Kip1}* null mice and with similar low penetrance (about 10%) (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996). These defects involve partial invasion of the rods and cones layer by the outer granular layer (Figure 7A). More importantly, these double mutant mice develop pituitary tumors with the same penetrance and latency as *p27^{Kip1}* single mutant animals. As illustrated in Figure 7B, 10-week-old *p27^{Kip1}*^{-/-} ($n = 3$) and *p27^{Kip1}*^{-/-};*Cdk2*^{-/-} mice ($n = 3$) displayed similar hyperplastic pituitary glands. Moreover, all *p27^{Kip1}*^{-/-} ($n = 6$) and *p27^{Kip1}*^{-/-};*Cdk2*^{-/-} ($n = 6$), but not *Cdk2*^{-/-} ($n = 6$), mice had

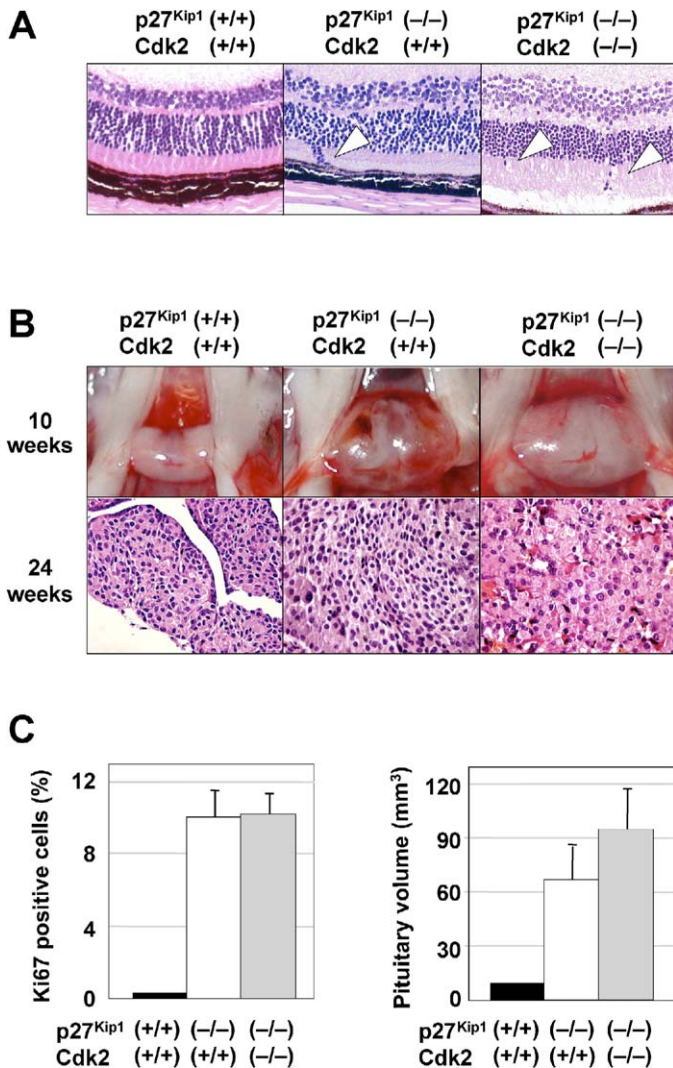


Figure 7. Loss of Cdk2 does not suppress the tumor suppressor properties of p27^{Kip1}.

A: H&E staining of sections of normal retinas obtained from p27^{Kip1}^{+/+}; Cdk2^{+/+} mice and of retinas obtained from p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{+/+} and p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{-/-} mice displaying the invasion of the rod and cone layer (arrowheads) by the outer granular layer.

B: Upper row: 10-week-old mice. Photographs of normal pituitary glands obtained from p27^{Kip1}^{+/+}; Cdk2^{+/+} mice and hyperplastic glands observed in p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{+/+} and p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{-/-} animals. Lower row: 24-week-old mice. H&E staining of sections of normal pituitary glands obtained from p27^{Kip1}^{+/+}; Cdk2^{+/+} mice and from pituitary tumors that developed in p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{+/+} and p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{-/-} double mutant mice.

C: Percentage of Ki67-positive cells and size of pituitary glands from 24-week-old p27^{Kip1}^{+/+}; Cdk2^{+/+} (filled bars), p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{+/+} (open bars), and p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{-/-} (gray bars) mice. All pituitary glands examined from p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{+/+} and p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{-/-} mice were neoplastic. Pituitary sections derived from five 6 month-old mice were analyzed. At least 3 different fields per section were counted and the resulting means \pm SD are represented.

pituitary tumors at six months of age (Figure 7B). These pituitary tumors display similar elevated proliferative indexes and volumes in p27^{Kip1}^{-/-} and p27^{Kip1}^{-/-}; Cdk2^{-/-} double mutant mice (Figure 7C). These results illustrate that Cdk2 does not

play a significant role in mediating the in vivo tumor suppressor activity of p27^{Kip1}.

Discussion

We and others have recently demonstrated that Cdk2 is not essential for the mitotic cell cycle in mammalian cells (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003). Now, we describe results that establish that Cdk2 is not essential for mediating either the cell cycle inhibitory or the tumor suppressing properties of p27^{Kip1} and p21^{Cip1}. Moreover, our results argue against an epistatic relationship between these Cip/Kip inhibitors and Cdk2, thus challenging one of the most widely established steps in the progression from the G1 to the S phase of the cell cycle.

Our findings illustrate that p27^{Kip1} and p21^{Cip1} can inhibit cell cycle progression in cells that lack Cdk2. These observations suggest either that Cdk2 is not the primary target of Cip/Kip inhibitors in vivo, or, alternatively, that p27^{Kip1} and p21^{Cip1} can block cell cycle progression by interacting with molecules other than Cdk2. Assuming the latter, the most likely compensatory molecules would be the Cdks involved in cell cycle progression, mainly Cdk1, Cdk3, Cdk4, and Cdk6. In fact, p27^{Kip1} mutant proteins defective in Cdk and cyclin binding are not effective in blocking cell cycle in Cdk2 null cells.

Cdk4 and Cdk6 are unlikely mediators of the cell cycle inhibitory properties of p27^{Kip1} and p21^{Cip1}, since it has been well illustrated that these inhibitors do not block the kinase activity of Cdk4/6-cyclin D complexes. Instead, increasing evidence supports the concept that Cip/Kip inhibitors help to stabilize Cdk4/6-cyclin D complexes (Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999). Recent genetic evidence also argues against a compensatory role of Cdk4 and Cdk6 in mediating p27^{Kip1} and p21^{Cip1} activities, since both of these molecules effectively block cell proliferation in MEFs lacking either Cdk4 and Cdk6, or the three D type cyclins (Malumbres et al., 2004; Kozar et al., 2004). Thus, it is unlikely that Cdk4 and Cdk6 mediate cell cycle inhibition by Cip/Kip inhibitors. On the other hand, we have recently shown, using shRNA strategies, that Cdk2 partially compensates for the absence of Cdk4 and Cdk6 in MEFs, most likely by a mechanism involving its interaction with D type cyclins (Malumbres et al., 2004). Thus, it is possible that if in cells lacking Cdk4 and Cdk6, Cdk2-cyclin D complexes are responsible for driving cells through G1, p27^{Kip1} and p21^{Cip1} may block cell cycle progression by inhibiting Cdk2-cyclin D kinase activity. Yet, this hypothesis would not explain how p27^{Kip1} and p21^{Cip1} inhibit the cell cycle in the absence of Cdk2.

Cdk3, a Cdk2-related kinase recently implicated in the G0/G1 transition (Ren and Rollins, 2004), is unlikely to serve as a compensatory molecule for Cdk2, since it is not functional in all the cells and mice used in this study (data not shown) due to a naturally occurring mutation in the *cdk3* locus of most laboratory strains of mice (Ye et al., 2001).

Cdk1 is also a candidate to compensate for the absence of Cdk2, since p27^{Kip1} and p21^{Cip1} bind to Cdk1 and inhibit its kinase activity (Toyoshima and Hunter, 1994; Harper et al., 1995), thus making Cdk1 a potential candidate to compensate for the absence of Cdk2. In agreement with these observations, we have detected p27^{Kip1} and p21^{Cip1} binding to Cdk1 and inhibition of its kinase activity in both wild-type and Cdk2-deficient cells (Figure 2). Moreover, a significant percentage of

Cdk2-deficient cells arrest in the G2/M phase of the cell cycle upon ectopic expression of p27^{Kip1}, thus suggesting that Cdk1 mediates at least some of the properties of these inhibitors in the absence of Cdk2. This hypothesis is supported by recent results demonstrating that ablation of p27^{Kip1} suppresses endoreplication of Skp2-deficient hepatocytes, an observation attributed to inhibition of Cdk1 by increased expression of p27^{Kip1} during the S/G2 transition (Nakayama et al., 2004). However, these observations do not explain how p27^{Kip1} and p21^{Cip1} effectively block cell cycle progression in G1 in the absence of Cdk2. Indeed, if we postulate that Cdk1 mediates all the cell cycle inhibitory activity of p27^{Kip1} and p21^{Cip1} in the absence of Cdk2, such a hypothesis would imply that Cdk1 must participate in driving the G1/S transition, a possibility that deserves further examination. To date, we have not been able to obtain Cdk1-deficient MEFs, since mice lacking this kinase die during the very early stages of embryonic development (our unpublished observations). Whether generation of Cdk1 conditional mutant cells or even shRNA approaches would help to resolve this issue remains to be determined.

Regardless of the molecular mechanisms responsible for the activity of p27^{Kip1} in cells lacking Cdk2, we find it remarkable that ablation of Cdk2 did not revert any of the phenotypes induced by loss of this tumor suppressor. These observations suggest either that Cdk2 may not be a physiological target of p27^{Kip1} or that mice may have additional targets equally responsible for mediating the tumor suppressor properties of p27^{Kip1} (Pagano, 2004). These findings are in sharp contrast with those recently reported for mice deficient for p27^{Kip1} and Skp2 (Nakayama et al., 2004). Concomitant ablation of these molecules restores most of the defects observed in p27^{Kip1} null animals, thus establishing an epistatic relationship between p27^{Kip1} and Skp2, the F box protein responsible for its degradation (Nakayama et al., 2004).

Loss of p27^{Kip1} expression is a common feature of many human cancers, an event frequently associated with poor prognosis (reviewed in Bloom and Pagano, 2003; Blain et al., 2003; Malumbres and Carnero, 2003). Likewise, a large fraction of human neoplasias carry mutations in the p53 pathway that prevent expression of p21^{Cip1} (reviewed in Lowe et al., 2004; Vousden and Prives, 2005). Although we realize that Cdk2 inhibition by selective inhibitors might have different effects than eliminating the Cdk2 protein, our findings raise a note of caution regarding the suitability of Cdk2 as a target for therapeutic intervention, at least in tumors lacking p27^{Kip1} or p21^{Cip1} expression. In any case, the results reported here should stimulate further work to identify essential mediator(s) of the tumor suppressor properties of the p27^{Kip1} and p21^{Cip1} cell cycle inhibitors.

Experimental procedures

Mice and tissues

p27^{Kip1}^{-/-}, p21^{Cip1}^{-/-}, and Cdk2^{-/-} mice have been described (Brugarolas et al., 1995; Kiyokawa et al., 1996; Ortega et al., 2003). Tissue samples were fixed in formalin for 24 hr and embedded in paraffin, and 3 μ m sections were analyzed after staining with hematoxylin and eosin (H&E). For proliferation studies, tissues were stained with Ki67-specific antibodies (Dako). All experiments involving mice were performed in accordance with institutional guidelines (CNIO Committee for the Use and Care of Experimental Animals) and the corresponding national regulations.

Cell culture

Primary MEFs were obtained from E13.5 embryos as reported (Ortega et al., 2003). For cell proliferation assays, we plated 5×10^4 cells on six-well plates and counted daily for 4 days. For S phase assays, P2 MEFs (10^6 cells per 10 cm dish) were placed in DMEM containing 0.1% FBS for 60 hr. Cells were restimulated by addition of 10% FBS. 50 μ M of BrdU was added 1 hr before harvesting at the indicated time points. DNA content was analyzed by flow cytometry (Coulter XL or FACScan from Becton-Dickinson). Focus formation assays were performed as described (Sotillo et al., 2001). For γ irradiation, MEFs were trypsinized and suspended in growth medium before irradiation at room temperature with a dose of 10 Gy. Cells were replated in growth medium at 40%–60% confluence. The percentage of cells in S phase was determined by flow cytometric analysis and by BrdU incorporation. For etoposide treatment, MEFs were grown in the presence of 5 μ M etoposide for 24 hr and collected 1 day later. Cell cycle profile was also determined using flow cytometry. For expression of p27^{Kip1} or p21^{Cip1}, phoenix cells were transfected with 6 μ g of ecotropic helper retrovirus plasmid (pCL-Eco) plus 6 μ g of pBabe vector encoding the corresponding proteins. The p21^{Cip1} mutant cDNA defective for PCNA binding (p21^{Cip1} Δ) was described previously (Cayrol et al., 1998). A Flag-tagged p27^{Kip1} cDNA was modified using in vitro mutagenesis (Stratagene) to obtain two cDNAs encoding a single (F64A) and a triple (L32H;P35A;F64A) mutant designated as p27^{Kip1}F64A and p27^{Kip1}3M, respectively (Lin et al., 1996; Kwon and Nordin, 1998). Supernatants were used to infect primary MEFs as described (Cheng et al., 1999). Cells were placed under puromycin selection and harvested 2–3 days later.

Western blot, immunoprecipitation, and kinase assays

Protein isolation and analysis was performed as described (Ortega et al., 2003). Protein extracts were immunoprecipitated by using antibodies against Flag (Sigma), Cdk1, Cdk2, Cdk4, cyclin E, or cyclin A (Santa Cruz Biotechnology). For Western blot analysis, protein lysates were transferred to nitrocellulose membranes and probed with antibodies against Cdk2, Cdk1, Cdk4, p21^{Cip1}, cyclin E, cyclin A, cyclin D2, or ERK (Santa Cruz Biotechnology), p27^{Kip1} (Transduction Laboratories), or β -actin (Sigma). For kinase assays, we used 1 μ g of mouse pRb protein fragment (amino acids 769–921; Santa Cruz Biotechnology) or histone H1 (Roche) as substrates.

Supplemental data

Supplemental data for this article can be found at <http://www.cancercell.org/cgi/content/full/7/6/591/DC1/>.

Acknowledgments

We thank Rut González, Marta San Román, Blanca Velasco, and Raquel Villar for excellent technical assistance, and Dr. Lucía Pérez for expert advice in histopathology. This work was supported by grants from the V Framework Programme of the European Union and from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) to M.B. and from the Comunidad Autónoma de Madrid, Fundación Ramón Areces, Fundación La Caixa, Acción Genómica y Proteómica (MCyT), and CICYT to M.M.. P.D. was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer. The CNIO is partially supported by the Red de Centros de Cáncer (RTICCC; FIS C03/10).

Received: October 29, 2004

Revised: March 29, 2005

Accepted: May 4, 2005

Published: June 13, 2005

References

- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* 13, 1775–1785.
- Blain, S.W., Montalvo, E., and Massague, J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1} with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J. Biol. Chem.* 272, 25863–25872.

- Blain, S.W., Scher, H.I., Cordon-Cardo, C., and Koff, A. (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3, 111–115.
- Bloom, J., and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41–47.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552–557.
- Cayrol, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311–320.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., and Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386–388.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999). The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18, 1571–1583.
- Collado, M., Medema, R.H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M.L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M., Serrano, M., and Lam, E.W. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27^{Kip1}. *J. Biol. Chem.* 275, 21960–21968.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21^{Cip1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
- Denicourt, C., and Dowdy, S.F. (2004). Cip/Kip proteins: More than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* 18, 851–855.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., et al. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* 85, 733–744.
- Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., and Kemp, C.J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177–180.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6, 387–400.
- Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721–732.
- Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicińska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., et al. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of d-cyclins. *Cell* 118, 477–491.
- Kwon, T.K., and Nordin, A.A. (1998). Identification of cdk2 binding sites on the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 16, 755–762.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847–862.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534–537.
- Lin, J., Reichner, C., Wu, X., and Levine, A.J. (1996). Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1786–1793.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307–315.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21^{Cip1}. *Nature* 375, 159–161.
- Malumbres, M., and Carnero, A. (2003). Cell cycle deregulation: A common motif in cancer. *Prog. Cell Cycle Res.* 5, 5–18.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493–504.
- Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P., and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* 61, 6234–6238.
- Nakayama, K., and Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: Brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020–1029.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., and Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707–720.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K.I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev. Cell* 6, 661–672.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martín, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat. Genet.* 35, 25–31.
- Pagano, M. (2004). Control of DNA synthesis and mitosis by the Skp2-p27-Cdk1/2 axis. *Mol. Cell* 14, 414–416.
- Reed, S.I. (2003). Ratchets and clocks: The cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 855–864.
- Ren, S., and Rollins, B.J. (2004). Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117, 239–251.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). Cdk inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Sotillo, S., Dubus, P., Martín, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). Wide spectrum of tumors in knock in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J.* 20, 6637–6647.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67–74.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2005). P53 and prognosis: New insights and further complexity. *Cell* 120, 7–10.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574–578.
- Ye, X., Zhu, C., and Harper, J.W. (2001). A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1682–1686.